



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

*O Efeito Trófico dos Derivados da Guanina em
Culturas de Astrócitos e Neurônios Cerebelares*

HELENA DECKER

**Orientadora: Dr^a Carla I. Tasca
Co-orientadora: Dr^a Carina Rodrigues Boeck**

Departamento de Bioquímica

Florianópolis, fevereiro de 2006.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

*O Efeito Trófico dos Derivados da Guanina em
Culturas de Astrócitos e Neurônios Cerebelares*

HELENA DECKER

**Orientadora: Dr^a Carla I. Tasca
Co-orientadora: Dr^a Carina Rodrigues Boeck**

Departamento de Bioquímica

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre.

Florianópolis, fevereiro de 2006.

Este trabalho foi realizado em colaboração com o ***Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto***, do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, tendo parte dos procedimentos experimentais sido realizados no Laboratório de Morfogênese Celular, durante estágio financiado pelo Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD/CAPES - No 0013/01-3), no desenvolvimento de projeto conjunto intitulado, “Diferenciação Celular, Plasticidade e Proteção Celular no Sistema Nervoso Central”.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por me acompanhar em todos os momentos da minha vida e ter me guiado pelo caminho da ciência, o qual aprecio demais.

Agradeço em especial aos meus pais, José e Teresinha, por todo apoio, amor e incentivo durante todas as etapas da minha vida.

Agradeço as minhas irmãs, Patrícia, Luciana e Morgana, por tornarem a minha vida tão divertida e cheia de vida.

À minha orientadora Carla I. Tasca, por toda a paciência e atenção dedicada a mim durante os anos de iniciação científica e durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a minha co-orientadora, Carina R. Boeck, pelo carinho e apoio durante o desenvolvimento deste estudo, que nos tornou grandes amigas.

Ao Professor Vivaldo Moura Neto, pela colaboração neste trabalho e por ter me recebido em seu laboratório de braços abertos.

Aos professores Andréia G. Trentin e Márcio Alvarez-Silva, pelo envolvimento neste trabalho e por permitir a realização da parte experimental em seu laboratório.

Agradeço em especial a minha grande amiga e braço direito, Tharine Dal-Cin, pela contribuição neste trabalho, pelo ombro amigo nas horas de dificuldades e pela companhia nas muitas horas de felicidade.

Agradeço a minha amiga Cláudia Nedel, por toda paciência, dedicação e carinho. E também aos momentos de descontração que tornam nossos experimentos ao mesmo tempo produtivos e divertidos.

Agradeço em especial aos meus amigos Tiago e Rossana, que tornaram muito agradável e inesquecível nossa estadia no Rio de Janeiro.

Agradeço a Luciana Romão por toda dedicação em ensinar seus conhecimentos, e pela afetiva acolhida tanto no laboratório, quanto no Rio de Janeiro.

Aos colegas de laboratório de Neuroquímica: Bruno, Carina, Cristiane, Ellen, Ronan, Samuel, Scheila, Simone, Tiago, Thaís, Tharine e Wagner, pela amizade e companheirismo durante todos os momentos.

Aos colegas do Laboratório de Hematologia e Morfologia Celular: Bruno, Cláudia, Marco, Meline, Pâmela, Ricardo G., Ricardo, Suellen, Talita, pela amizade e pelo apoio, o qual tornou muito agradável a nossa convivência.

Aos colegas do Laboratório de Morfogênese Celular da UFRJ: Bruno, Jane, Luciana, Natan, Patrícia, Rose, Scheila, Suzana, Tércia, por toda paciência e amizade desenvolvida durante meu estágio na UFRJ.

Ao Biotério Central, pelo fornecimento de animais.

Ao secretário da Pós-graduação em Neurociências, Nivaldo, por estar sempre pronto pra ajudar e nos atender da melhor forma.

À secretária Rosângela, pelo carinho e apoio durante todo o período de estágio na UFRJ.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Neurociências.

À CAPES pelo financiamento da bolsa de estudo, ao CNPq pelos auxílios financeiros e ao PROCAD por permitir o meu estudo na UFRJ, o qual foi essencial pra o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus cunhados, André e Douglas, pela força e incentivo.

À Luciana e o André, pela paciência e apoio durante as montagens das fotos e representações esquemáticas... Obrigada!

E ao meu amor, Diego, que esteve ao meu lado nos últimos meses, tornando minha vida repleta de luz.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. PURINAS.....	1
1.1.1. RECEPTORES E TRANSPORTADORES PURINÉRGICOS.....	2
1.1.2. DERIVADOS DA GUANINA (DG).....	6
1.1.3. DERIVADOS DA GUANINA E TRASMISSÃO GLUTAMATÉRGICA.....	7
1.1.4. EFEITOS TRÓFICOS DAS PURINAS.....	8
1.1.4.1. Efeitos tróficos dos nucleotídeos e nucleosídeos DG.....	10
1.2. PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR.....	11
1.2.1. Laminina.....	13
1.2.2. Fibronectina.....	15
1.3. INTERAÇÃO NEURÔNIO-ASTRÓCITO.....	19
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. OBJETIVO GERAL.....	21
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1. MATERIAIS.....	22
3.1.1. Reagentes.....	22
3.1.2. Equipamentos.....	23
3.2. ANIMAIS.....	24
3.3. CULTURAS DE CÉLULAS.....	24
3.3.1. Astrócitos.....	24
3.3.2. Neurônios.....	25
3.4. TRATAMENTO DAS CULTURAS.....	25

3.4.1. Astrócitos.....	25
3.4.2. Co-culturas.....	25
3.4.2. Neurônios.....	26
3.5. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	26
3.5.1. Método de redução do MTT.....	26
3.5.2. Detecção de apoptose.....	26
3.5.3. Contagem do número de células.....	27
3.6. IMUNOCITOQUÍMICA.....	28
3.6.1. Fixação das células.....	28
3.6.2. Imunomarcção da GFAP.....	28
3.6.3. Imunomarcção de Fibronectina e Laminina.....	28
3.6.4. Imunomarcção de β -tubulina III.....	29
3.6.5. Avaliação de vias de sinalização.....	29
3.7. IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS.....	29
3.7.1. Preparação da amostras.....	29
3.7.2. Separação de proteínas.....	30
3.7.3. Eletrotransferência e imunodeteção.....	30
3.8. MORFOMETRIA.....	31
3.9. ENSAIO DE ADESÃO CELULAR.....	31
3.10. DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	32
3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
4. RESULTADOS.....	33
4.1. AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DOS ASTRÓCITOS APÓS TRATAMENTO COM GMP OU GUO... ..	33
4.2. PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC).....	35
4.2.1. Avaliação da Expressão das Proteínas da MEC.....	37
4.2.2. Avaliação das vias de sinalização celular envolvidas na modulação das proteínas da MEC.....	40
4.3. O EFEITO DO MEIO CONDICIONADO DE ASTRÓCITOS TRATADOS COM GMP OU GUO SOBRE NEURÔNIOS EM CULTURA.....	43
4.3.1. O efeito do meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO sobre o número de neurônios.....	43

4.3.2. O efeito do meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO sobre o crescimento neurítico.....	45
4.3.3. O efeito do meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO sobre a viabilidade neuronal.....	47
4.3.4. O efeito do meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO sobre a adesão celular.....	51
4.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM GMP OU GUO DIRETAMENTE SOBRE NEURÔNIOS CULTIVADOS EM MEIO NEUROBASAL.....	53
4.4.1. O efeito do tratamento com GMP ou GUO sobre o número de neurônios em cultura.....	53
4.4.2. O efeito do tratamento direto com GMP ou GUO sobre o crescimento neurítico.....	55
4.4.3. O efeito do tratamento com GMP ou GUO sobre a viabilidade celular neuronal.....	57
4.4.4. Mecanismo de ação do efeito GMP ou GUO sobre o número de neurônios em cultura...	61
4.4.4.1. Participação dos receptores de adenosina (ADO) no aumento de número de neurônios em cultura induzido por GMP e GUO.....	61
4.4.4.2. Participação dos receptores glutamatérgicos no aumento de número de neurônios em cultura induzido por GMP e GUO.....	68
4.4.4.3. Avaliação das vias de sinalização.....	72
4.5. COMPARAÇÃO DO EFEITO DE GMP OU GUO SOBRE O NÚMERO DE NEURÔNIOS CEREBELARES CULTIVADOS EM TRÊS DIFERENTES PROTOCOLOS DE CULTURA.....	78
5. DISCUSSÃO.....	81
6. CONCLUSÕES.....	93
7. PERSPECTIVAS.....	95
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática dos receptores de purinas expressos pelos astrócitos.....	4
Figura 2: Representação esquemática das possíveis ações dos nucleotídeos e nucleosídeos nas células do SNC.....	8
Figura 3: Representação esquemática da MEC.....	11
Figura 4: Estrutura da Laminina.....	12
Figura 5: Estrutura da Fibronectina.....	13
Figura 6: Representação esquemática da ativação das integrinas.....	15
Figura 7: Avaliação da morfologia astrocitária após o tratamento com GMP ou GUO.....	34
Figura 8: Efeito do tratamento de astrócitos com GMP ou GUO por 24h, sobre a organização da fibronectina e laminina.....	36
Figura 9: Avaliação da expressão da fibronectina em astrócitos tratados com GMP ou GUO....	38
Figura 10: Avaliação da expressão da laminina em astrócitos tratados com GMP ou GUO.....	39
Figura 11: Efeito de inibidores de proteínas quinases na reorganização da fibronectina induzida por GUO em astrócitos.....	41
Figura 12: Meio Condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO aumenta o número de neurônios granulares do cerebelo.....	44
Figura 13: Avaliação da viabilidade celular em neurônios granulares do cerebelo cultivados em meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO.....	48
Figura 14: Imagens de microscopia de fluorescência de neurônios corados com HOESCHT 33342, após 24h de cultivo em meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO....	49
Figura 15: Efeito de GMP e GUO na indução de apoptose em neurônios cerebelares cultivados	

em meio condicionado de astrócitos.....	50
Figura 16: Meio Condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO aumenta a adesão celular em neurônios granulares do cerebelo.....	52
Figura 17: Tratamento com GMP ou GUO aumenta o número de neurônios cerebelares em cultura purificada.....	54
Figura 18: Avaliação da viabilidade celular em neurônios granulares do cerebelo cultivados em meio Neurobasal na presença de GMP ou GUO.....	58
Figura 19: Imagens de microscopia de fluorescência de neurônios corados com HOESCHT 33342, após 24h de cultivo em meio Neurobasal na presença de GMP ou GUO.....	59
Figura 20: Efeito de GMP e GUO na indução de apoptose em neurônios cerebelares cultivados em meio neurobasal.....	60
Figura 21: Imagens de microscopia de fluorescência de neurônios cerebelares corados com HOESCHT 33342, após 24h de cultivo em meio Neurobasal na presença de GMP e ligantes do sistema adenosinérgico.....	63
Figura 22: Imagens de microscopia de fluorescência de neurônios corados com HOESCHT 33342, após 24h de cultivo em meio Neurobasal na presença de GUO e ligantes do sistema adenosinérgico.....	65
Figura 23: Efeito de ligantes do sistema adenosinérgico no número de neurônios cerebelares tratados com GMP ou GUO.....	67
Figura 24: Imagens de microscopia de fluorescência de neurônios corados com HOESCHT 33342, após 24h de cultivo em meio Neurobasal na presença de GMP ou GUO e antagonistas glutamatérgicos.....	69
Figura 25: Efeito de antagonistas de receptores glutamatérgicos no número de neurônios cerebelares tratados com GMP ou GUO.....	

cerebelares tratados com GMP ou GUO.....	71
Figura 26: Imagens de microscopia de fluorescência de neurônios cerebelares corados com HOESCHT 33342, após 24h de cultivo em meio Neurobasal na presença de GMP e inibidores de proteínas quinases.....	73
Figura 27: Imagens de microscopia de fluorescência de neurônios corados com HOESCHT 33342, após 24h de cultivo em meio neurobasal na presença de GUO e inibidores de proteínas quinases.....	75
Figura 28: Efeito de inibidores de proteínas quinases no número de neurônios cerebelares tratados com GMP ou GUO.....	77
Figura 29: Efeito de GMP (A) ou GUO (B) sobre o número de neurônios granulares do cerebelo.....	79
Figura 30: Representação esquemática da reorganização das proteínas da MEC e possíveis vias de sinalização ativadas por GMP ou GUO.....	83
Figura 31: Representação esquemática das vias de sinalização induzidas por GMP ou GUO sobre neurônios cultivados em meio condicionado de astrócitos tratados com DG, e em neurônios cultivados em meio Neurobasal tratados com DG.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. O cultivo de neurônios granulares do cerebelo em meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO não altera a neuritogênese.....	46
Tabela 2. O cultivo de neurônios granulares do cerebelo em meio Neurobasal na presença de GMP ou GUO não altera a neuritogênese.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

8-PT - 8-fenil-teofilina

ADA - Adenosina desaminase

ADO – Adenosina

AMPA - Alfa-amino-3-hidróxi-metilisoxazolepropionato

AMPc - Adenosina monofosfato cíclica

ATP – 5'adenosina trifosfato

BrdU - Anti-bromodeoxiuridina

BSA - Albumina sérica bovina

Ca⁺⁺ - Cálcio

CaM-KII - Proteína quinase II dependente de cálcio-calmodulina

CHEL - Queleretrina

Cy3 – Anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à rodamina

DA - Derivados da adenina

DG - Derivados da guanina

DMEM/F12 - Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DPCPX - 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine

EDTA – Ácido etileno dinitrilo tetra acético

EGF - Fator de crescimento epidérmico

FAK - Quinases de adesão focal

FBS - Soro fetal bovino

FGF - Fator de crescimento fibroblástico

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

FN - Fibronectina

GAMS - γ -D-glutamilamino-metilulfonato

GDP - 5'guanosina difosfato

GFAP - Proteína glial fibrilar ácida

GLU – Glutamato

GMP - Guanosina 5'-monofosfato

GMPC - Guanosina 3', 5' - monofosfato cíclica

GppNHp – 5' guanilil-imido-difosfato

GUO - Guanosina

IP3 - Inositol-1,4,5-trifosfato

KA - Cainato

Kda - kilo daltons

LN - Laminina

LTP - Potencial de longa duração

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno

MEC - Matriz Extracelular

MEK - Proteína quinase quinase ativada por mitógeno

MK-801 - (+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo(a,b)ciclohepteno-5,10-imina

MTT - (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium brometo = Thiazolyl blue).

NGF - Fator de crescimento do nervo

NGS - Soro normal de cabra

NMDA - N-metil-D-aspartato

NT-3 - Neurotrofina-3

PBS – Solução salina tamponada por fosfato

PC12 – Linhagem celular Pheochromocytoma 12

PF – Paraformaldeído

PI3-K - Proteína quinase 3-fosfoinositol

PKA - Proteína quinase dependente de AMPc

PKC - Proteína quinase C

PNP - Purina nucleosídeo fosforilase

Proteína-G - Proteínas de ligantes de nucleotídeos da guanina

SDS - Duodecil sulfato de sódio

T3 – Hormônio da tireóide

TGF - Fator de crescimento transformante

WORT - Wortmanina

RESUMO

Os derivados da guanina (DG) têm sido implicados em diversas funções extracelulares importantes, como a modulação da transmissão glutamatérgica e efeitos tróficos em neurônios e astrócitos. Resultados prévios obtidos em nosso laboratório demonstram que guanosina-5'-monofosfato (GMP) ou guanosina (GUO) promove alterações na organização das proteínas da matriz extracelular (MEC), laminina e fibronectina, em astrócitos. Também foi observado um aumento expressivo no número de neurônios cerebelares cultivados em co-cultura com astrócitos pré-tratados com GMP ou GUO. O objetivo deste estudo foi avaliar o papel neurotrófico dos nucleotídeos e nucleosídeos derivados da guanina em culturas de neurônios cerebelares de ratos. Para investigar se o aumento do número de neurônios em co-cultura é proveniente da interação neurônio-astrócito, neurônios cerebelares foram cultivados em meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO (1 μ M, 100 μ M ou 1 mM) ou em meio Neurobasal na presença de GMP ou GUO (1 μ M, 100 μ M ou 1 mM), por 24h. Nos dois protocolos de cultura foi observado intenso aumento no número de neurônios quando comparado a situação controle. Entretanto o número de neuritos por neurônios ou o comprimento total dos neuritos não foi alterado. Foi verificada que a viabilidade celular foi mantida, porém GMP ou GUO promoveu uma maior adesão celular de neurônios cerebelares, possivelmente por ativar vias de sinalização intracelular que desencadeiam alterações nas proteínas do citoesqueleto celular e/ou devido às alterações na organização das proteínas da MEC. Além disso, foi verificado o envolvimento de receptores A_{2A} de adenosina e de glutamato, e das vias de sinalização das proteínas ERK, CaMKII, PKC, PI3-K e PKA no aumento do número de neurônios induzido pelo tratamento com GMP ou GUO. Estes resultados demonstram que GMP ou GUO aumenta o número de neurônios em cultura por modular a organização das proteínas da MEC e/ou a adesão celular.

ABSTRACT

Guanine-derived nucleotides and nucleoside (GD) have been implicated in diverse important extracellular functions, such as modulation of glutamatergic transmission and trophic effects on neurons and astrocytes. Previous results in our laboratory have shown guanosine-5'-monophosphate (GMP) or guanosine (GUO) promote alterations in the organization of extracellular matrix (ECM) proteins, laminin and fibronectin, in astrocytes. A significant increase in the number of cerebellar neurons was also observed in coculture with astrocytes pretreated with GMP or GUO. The aim of this study was to analyze the putative neurotrophic role of GD on granular cerebellar neurons. To evaluate if the increase of the neurons number was determined by neuron-astrocyte interactions, the granular cerebellar neurons were cultured in conditioned medium obtained from astrocytes treated with GMP or GUO (1 μ M, 100 μ M or 1 mM), or in Neurobasal medium with GMP or GUO (1 μ M, 100 μ M or 1 mM) for 24h. In the two culture models a significant increase in the number of neurons was observed after 24h, when compared with the control. However, the number of neurites per neuron or the neurites length was not altered. The cell viability was not altered, but GMP or GUO improved the neuronal cell adhesion, possibly by activation intracellular signal transduction, that mediate cytoskeletal changes and/or due to modulate the organization of ECM proteins. Besides that, was observed that A_{2A} adenosine and glutamate receptors, and signaling pathways of CaMKII, PKC, PI3-K and PKA proteins are involved in increase of neurons number induced by treatment with GMP or GUO. These results demonstrate that GUO and GMP improved the neurons number in culture due to modulate the organization of ECM proteins and/or modulate cell adhesion molecules.

1. INTRODUÇÃO

1.1. PURINAS

As bases nitrogenadas derivadas da purina, como a adenina e a guanina, e seus correspondentes nucleosídeos e nucleotídeos, participam na regulação da função celular. Agem como mensageiros intercelulares que afetam a função cardíaca, agregação plaquetária e tônus vascular (SOLINI, 2005). Além disso, evidências indicam que as purinas estão envolvidas em mecanismos intracelulares, exercendo influência no metabolismo energético, síntese de ácidos nucléicos e colesterol e na ativação de uma variedade de receptores de membrana (NEARY, 1996; ABBRACCHIO & BURNSTOCK, 1998).

As purinas são muito estudadas pelo papel neuromodulatório que exercem no Sistema Nervoso Central (SNC) (SOARES et al., 2004). Fortes evidências demonstram que as purinas também exercem importante papel na fisiopatologia de numerosas enfermidades crônicas e agudas do SNC (CICARRELLI et al., 2001).

No meio extracelular, as purinas são reconhecidas como moléculas sinalizadoras de efeitos tróficos, influenciando o crescimento, diferenciação e morte celular (RATHBONE, 1992; RATHBONE, 1998). Em condições fisiológicas, os astrócitos, principal fonte de purinas, podem liberar tanto os derivados da adenina (DA) quanto os derivados da guanina (DG). Sob condições de hipóxia/isquemia, as células astrocitárias podem liberar os DA e/ou DG até três vezes mais do que em condições normais (CICCARELLI et al, 1999).

1.1.1. RECEPTORES E TRANSPORTADORES PURINÉRGICOS

Os receptores purinérgicos melhor caracterizados são do tipo P1 (subtipos A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃), sendo a adenosina (ADO) seu principal ligante, e do tipo P2 (subtipos P2Ys e P2Xs), que tem o nucleotídeo adenosina-5'-trifosfato (ATP) como principal ligante. Os receptores de ADO do subtipo A₁ são acoplados às proteínas de ligantes de nucleotídeos da guanina (proteínas-G) do tipo G_i, enquanto os receptores do subtipo A₂ são acoplados às proteínas-G_s e promovem a inibição ou estimulação da produção intracelular de adenosina-5'-monofosfato cíclico (AMPC), respectivamente (STONE, 1991). Existem evidências que a união de ADO aos receptores A₂ estimula a proliferação astrocitária, enquanto sua ação nos receptores A₁ e/ou A₃ inibem este estímulo, controlando assim o excesso de astrogliose estimulada via receptor A₂ (CICCARELLI et al., 2001). A ativação de receptores A₁ também estimula os astrócitos a produzir fatores tróficos, como o fator de crescimento fibroblástico (FGF), o fator de crescimento de transformação-β (TGFβ) e a proteína S100β, os quais contribuem para a proteção neuronal frente a uma injúria. Além disso, o nucleosídeo guanosina (GUO) estimula a produção de purinas da adenina pelos astrócitos (CICCARELLI et al., 2001).

Os receptores do tipo A₃ são acoplados às proteínas-G_i e -G_q (raramente), e sua ativação aumenta a hidrólise de fosfatidilinositóis através da ação da fosfolipase C (ABBRACCHIO et al., 1995). A estimulação dos receptores P2Y também ativa a fosfolipase C, o que desencadeia o aumento de cálcio (Ca⁺⁺) citosólico livre, ativando a proteína quinase C (PKC), liberando ácido araquidônico e estimulando a formação de prostanóides (CICARRELLI et al., 2001). NEARY & ZHU (1994) verificaram que a

ativação de receptores P2Y₁ e P2Y₂ em astrócitos, ativa a via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), a qual exerce importante controle sobre a proliferação e diferenciação celular.

Os receptores das purinas da guanina ainda estão sendo caracterizados. Evidências mostram que as purinas da guanina se unem aos receptores das purinas da adenina com baixa afinidade (MULLER & SCION, 1993), o que sugere que as purinas da guanina unam-se a sítios diferentes das purinas da adenina. Foi demonstrado que GTP une-se a sítios específicos em células de feocromocitoma (PC12) (GYSBERS et al., 2000) e em membranas cerebelares de pintos, sítios estes que não apresentam atividade enzimática (GTPásica) (TASCA et al., 1999a), o que sugere a presença de verdadeiros sítios receptores. Além disso, em estudos recentes foram identificados e caracterizados farmacologicamente sítios específicos de união para a GUO em preparações de membrana de cérebro de ratos (TRAVERSA et al., 2002), em cultura de astrócitos (CHEN et al., 1993) e em células PC12 (BAU et al., 2005).

Na Figura 1 observa-se uma representação esquemática dos receptores de purinas expressos pelos astrócitos e as principais vias de transdução de sinal ativadas ou inibidas através da ativação destes receptores.

Após a liberação pelos astrócitos, as purinas da adenina e da guanina são metabolizadas por ecto-enzimas específicas, como as nucleotidases, adenosina desaminase e purina nucleosídeo fosforilase, o que regula os efeitos dos nucleotídeos e nucleosídeos.

Os transportadores de nucleosídeos compreendem uma família de proteínas com afinidade para substratos distintos, distribuição variável pelo tecido cerebral, diferente especificidade entre as espécies e sensibilidade ao bloqueio por agentes farmacológicos. Os transportadores de nucleosídeos funcionam de forma bidirecional, modulando a

concentração dos nucleosídeos presentes na fenda sináptica. ADO apresenta um sistema específico de transporte que regula a quantidade de ADO para interagir com seus receptores na membrana celular. Nos astrócitos, os transportadores de nucleosídeos apresentam maior capacidade de transportar ADO em relação aos neurônios, exercendo papel mais importante na regulação dos efeitos da ADO no SNC (BENDER et al., 1994; GU et al., 1996).

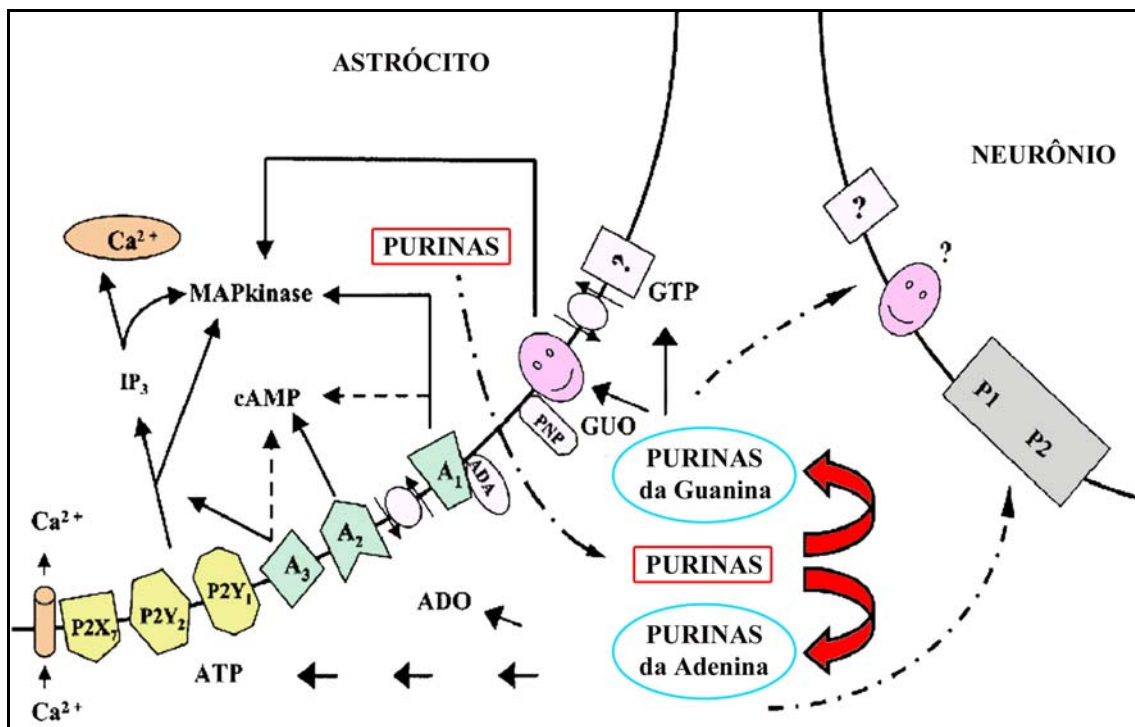


Figura 1: **Representação esquemática dos receptores de purinas expressos pelos astrócitos e neurônios**, adaptado de CICCARELLI et al., 2001. Os receptores das purinas da adenina já caracterizados compreendem o tipo P1 (subtipos A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃), sendo a ADO seu principal ligante, e do tipo P2 (subtipos P2Ys e P2Xs), que tem o ATP como principal ligante. Os receptores das purinas da guanina ainda estão sendo caracterizados. Adenosina desaminase (ADA), inositol-1,4,5-trifosfato (IP3), purina nucleosídeo fosforilase (PNP).

1.1.2. DERIVADOS DA GUANINA (DG)

Os nucleotídeos da guanina estão implicados em numerosas funções intracelulares, como na síntese de proteínas, na sinalização transmembrana, translocação de proteínas no retículo endoplasmático, controle do movimento vesicular nas células, diferenciação e proliferação celular (BOURNE et al., 1990). Os nucleotídeos GTP e guanosina-5'-difosfato (GDP) apresentam um papel intracelular essencial no ciclo de ativação/inativação das proteínas-G. Estas proteínas com atividade GTPásica realizam a transdução do sinal extracelular em respostas celulares específicas, sendo sua ativação e a conseqüente modulação de proteínas efetoras intracelular dependente da troca do GDP pelo GTP intracelular, formando um complexo proteína-G/GTP, que diminui a afinidade dos receptores acoplados aos seus neurotransmissores específicos e modula a atividade de efetores específicos. Uma atividade GTPásica intrínseca às proteínas-G promove a hidrólise do GTP a GDP, levando as proteínas-G ao seu estado inativo. Até então, não foi demonstrada nenhuma interação de guanosina-5'-monofosfato (GMP) e de GUO com as proteínas-G (EXTON, 1998; MORRIS & MALBON, 1999).

Os DG também apresentam importante papel extracelular, como moléculas de sinalização intercelular. SANTOS e colaboradores (2006) demonstraram que GTP pode ser captado e armazenado em vesículas sinápticas, o que reforça a importância dos nucleotídeos como neurotransmissores. Diversas evidências mostram o papel dos DG na modulação da transmissão glutamatérgica (SOUZA & RAMÍREZ, 1991; TASCA & SOUZA, 2000).

1.1.3. DERIVADOS DA GUANINA E TRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA

A interação entre o sistema purinérgico e o glutamatérgico é um tema intensamente estudado. Os DG inibem a transmissão glutamatérgica através da inibição da união de glutamato (e análogos sintéticos) a seus receptores (SOUZA & RAMÍREZ, 1991; TASCA et al., 1999b; TASCA & SOUZA, 2000). Vários estudos demonstraram que GMP, GDP e GTP podem inibir a união de L-[³H] glutamato e agonistas ionotrópicos [N-metil-D-aspartato (NMDA), alfa-amino-3-hidróxi-metilisoxazolepropionato (AMPA) e kainato (KA)] a seus receptores, sem interagirem com as proteínas-G (MONAHAN et al., 1988; PAZ et al., 1994; DEV et al., 1996, PAAS et al., 1996; TASCA et al., 1999a; BURGOS et al., 1998; PORCIÚNCULA et al., 2002).

Utilizando-se fatias de estruturas cerebrais de ratos, foi demonstrado que os DG inibem a fosforilação da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (TASCA et al., 1995) e o acúmulo de AMPc induzido por glutamato e análogos dos receptores metabotrópicos (TASCA et al., 1998; TASCA et al., 1999b).

Estudos avaliando a neurotoxicidade induzida por glutamato *in vivo* demonstraram que os DG administrados via intraperitoneal (MALCON et al., 1997; SCHMIDT et al., 2000), intracerebroventricular (SCHMIDT et al., 2005) ou via oral (LARA et al., 2001), protegem contra a lesão neuronal e contra convulsões induzidas pela injeção de ácido quinolínico (agonista do receptor NMDA). Estudos comportamentais observaram que GMP reverte o efeito de glutamato em testes como a esQUIVA inibitória (RUBIN et al., 1996; RUBIN et al., 1997).

Em estudos avaliando a excitotoxicidade *in vitro*, foi observado que os DG protegem contra a toxicidade em modelos de hipóxia (REGNER et al., 1998), de isquemia induzida

quimicamente (MOLZ et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002), e em modelos de toxicidade induzida por glutamato e privação de glicose (MOLZ et al., 2005).

Já foi demonstrado-se que os DG exercem modulação sobre o transporte de glutamato, tanto por inibir seletivamente a captação vesicular de glutamato (TASCA et al., 2004), quanto por aumentar a recaptação de glutamato em astrócitos corticais (FRIZZO et al., 2001). Além disso, foi demonstrado que DG induzem intensa liberação sinaptossomal de glutamato (SANTOS, 2005), e que GUO reverte o aumento da liberação sinaptossomal de glutamato estimulada por ácido quinolínico (TAVARES et al., 2005).

1.1.4. EFEITOS TRÓFICOS DAS PURINAS

As purinas, no meio extracelular, podem agir como fatores tróficos, exercendo regulação no desenvolvimento neural, proliferação e apoptose das células gliais e endoteliais dos vasos sanguíneos, além de regular a plasticidade neural e a resposta a doenças do sistema nervoso. Os nucleotídeos e nucleosídeos podem agir como agentes tróficos de diversas maneiras: (1) induzindo alterações funcionais nas células gliais, as quais são instrumentos para diferenciação neuronal, sobrevivência e regeneração; (2) estimulando células gliais e neurônios a produzirem substâncias tróficas; (3) aumentar os efeitos de substâncias tróficas nas células gliais e neurônios; (4) interagir diretamente com as células neuronais; (5) agir através da combinação de (1)-(4) (RATHBONE et al. 1999). Na Figura 2 pode-se visualizar possíveis ações dos nucleotídeos e nucleosídeos nas células do SNC.

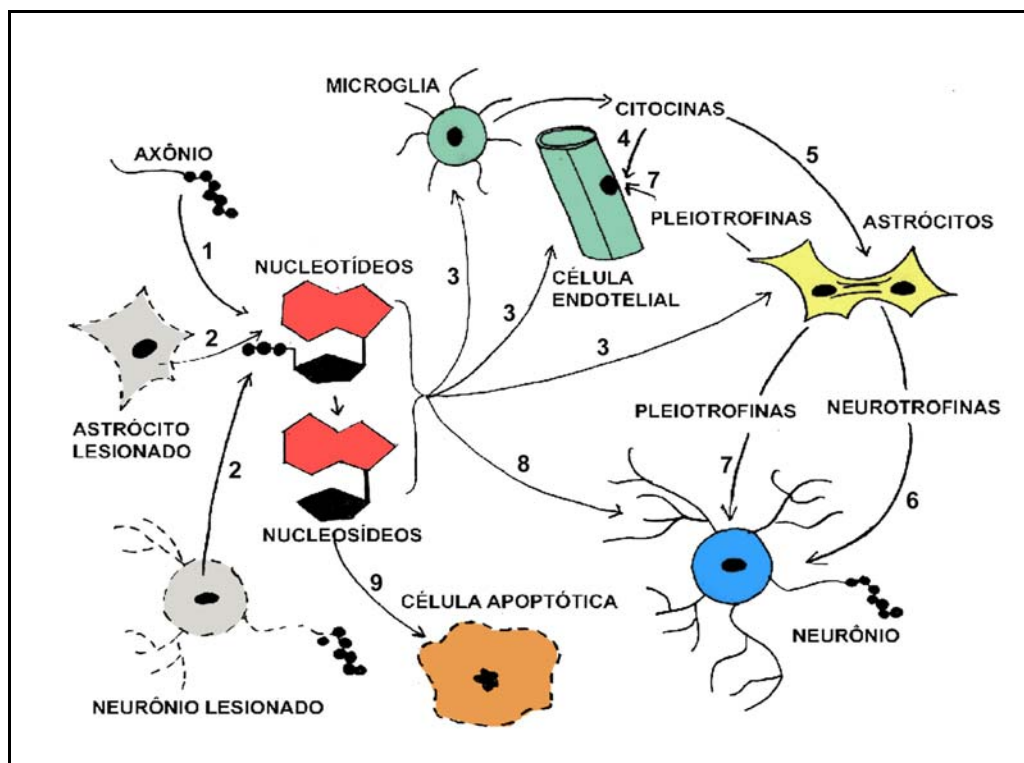


Figura 2: **Representação esquemática das possíveis ações dos nucleotídeos e nucleosídeos nas células do SNC**, adaptado de NEARY et al., 1996. (1) Liberação neuronal de nucleotídeos em condições fisiológicas; (2) Liberação de nucleotídeos sob condições de injúrias das células neurais; (3) Nucleotídeos e nucleosídeos podem estimular a proliferação de células gliais e endoteliais; (4) A microglia ativada libera fatores de crescimentos peptídicos e citocinas, os quais estimulam a proliferação de células endoteliais e gliais, e tornam os astrócitos ativados; (5) Os nucleotídeos e nucleosídeos podem agir sinergicamente com citoninas, contribuindo para plasticidade celular; (6) Os astrócitos ativados liberam neurotrofinas e (7) pleiotrofinas; (8) Tanto os fatores de crescimento, quanto os nucleotídeos e nucleosídeos aumentam o crescimento neurítico; (9) Indução de apoptose.

1.1.4.1. Efeitos tróficos dos nucleotídeos e nucleosídeo DG

Efeitos tróficos são observados em células gliais e em neurônios em cultura na presença de DG (RATHBONE et al., 1999). Estes efeitos podem ser indiretos através do aumento na produção de neurotrofinas, como o fator de crescimento do nervo (NGF) e a neurotrofina-3 (NT-3), e pleiotrofinas, como o FGF ou a proteína S100 β , ligante de cálcio, em culturas de astrócitos (CICCARELLI et al., 2001). Estudos recentes mostram que GUO exógena exerce efeitos mitogênicos em astrócitos corticais de ratos, os quais são mediados por mecanismos envolvendo a participação de receptores de ADO e fatores solúveis derivados da microglia (CICCARELLI et al., 2000). Apesar destes efeitos da GUO envolverem a ativação de receptores de ADO, a adição de antagonistas de receptores de ADO não bloqueia alguns destes efeitos em células PC12 (GYSBERS & RATHBONE, 1992). Este efeito sugere que a GUO exerce suas funções através da sua união em sítios específicos independentes dos receptores da ADO.

Já foi demonstrado, em estudos realizados com astroblastos de pintos, que GUO e seus nucleotídeos estimulam a proliferação celular (KIM et al., 1991). GTP ou GUO promove arborização e crescimento de neuritos em neurônios hipocâmpais em co-cultura com astrócitos (RATHBONE & JUURLINK, 1993). Além disso, observou-se efeitos neuritogênicos induzidos por GTP em células PC12, decorrente de um moderado e constante influxo de cálcio, através da ativação de canais de cálcio do tipo-L (dependentes de voltagem) e liberação de cálcio das vesículas intracelulares (GYSBERS et al., 2000).

Resultados de nosso laboratório demonstram que há um aumento expressivo do número de neurônios em co-cultura com astrócitos tratados com GMP ou GUO. A neuritogênese e a proliferação destes neurônios não foram alteradas. Além disso, o

tratamento de astrócitos com GMP ou GUO alterou a organização de proteínas da matriz extracelular (MEC), como a laminina (LN) e a fibronectina (FN) (FRANCISCO, 2004), demonstrando o envolvimento das proteínas da matriz extracelular no efeito do derivados da guanina.

1.2. PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR

A MEC corresponde a um complexo multifuncional de proteínas e proteoglicanos, produzido pelas próprias células e altamente organizado para proporcionar a integridade estrutural e servindo de substrato para adesão da maioria das células em organismos vivos (VENSTRON & REICHARDT, 1993) (Figura 3). O reconhecimento dinâmico entre as células e a MEC, assim como a mobilização de diversos fatores de crescimento para remodelação da MEC resulta em transdução de sinal, regulação da expressão gênica e modificação de processos celulares como diferenciação, proliferação, adesão e migração celular (SECHELER & SCHWARZBAUER, 1998; STREULI, 1999; PESHEVA & PROBSTMEIER, 2000).

Os efeitos da MEC nos processos celulares são mediados por receptores chamados integrinas. As integrinas traduzem o sinal extracelular para o citoplasma da célula envolvendo mudanças no citoesqueleto bem como em proteínas GTPases e quinases (KUCHENBAUER et al., 2001; SCHWARTZ, 2001). Muitos dos componentes da MEC foram descobertos em tecidos não-neurais e incluem a fibronectina, laminina, vitronectina, colágenos, proteoglicanos, tenascina e trombospondina, porém grande parte destes está expressa no SNC (LETOUNEAU et al., 1994). A LN e a FN, que são expressas no SNC e exercem importante papel na interação neurônio-astrócito, serão abordadas neste estudo.

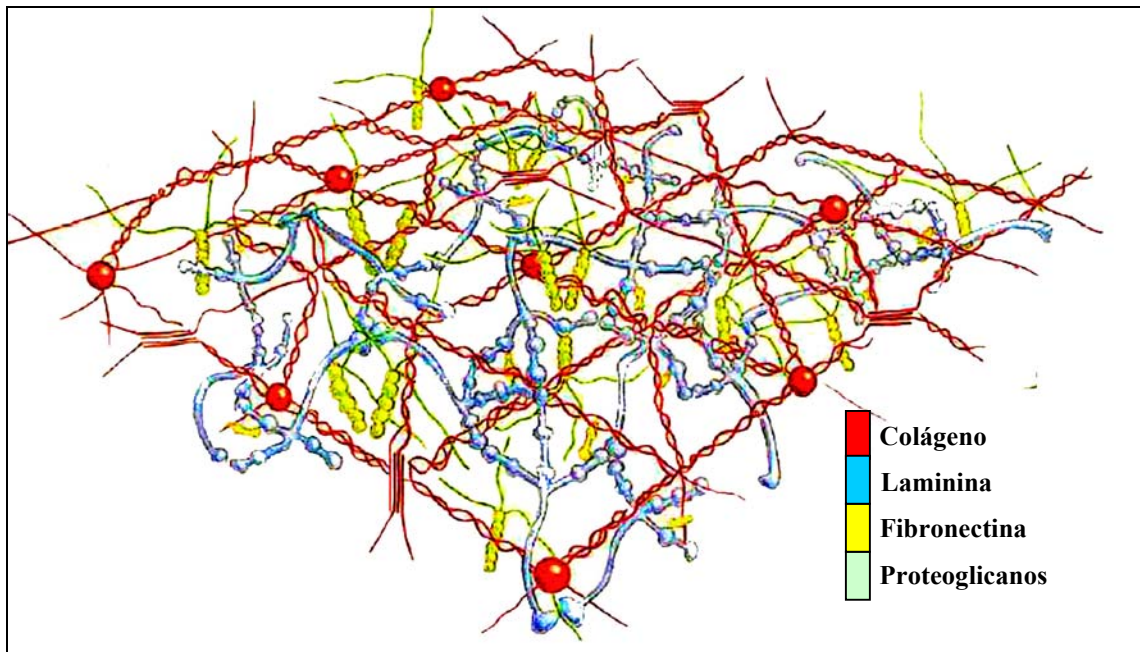


Figura 3: **Representação esquemática da MEC**, adaptado de ALBERTS et al., 2002. A MEC corresponde a um complexo multifuncional de proteínas e proteoglicanos altamente organizado para proporcionar a integridade estrutural e servir de substrato para adesão da maioria das células em organismos vivos

1.2.1. Laminina

Depois dos colágenos, a laminina (LN) é o maior componente da MEC. A LN é uma glicoproteína de aproximadamente 70 nm de comprimento, formada por uma cadeia α de 400 KDa e por duas cadeias β ($\beta 1$ e $\beta 2$), de aproximadamente 215 KDa e 205 KDa, respectivamente (Figura 4). A LN é sintetizada e secretada pelos astrócitos, depositada nos espaços extracelulares e fixada na superfície celular através da interação com as integrinas (FARWELL et al., 1995; HYNES, 1987). A regionalização das moléculas de LN na MEC é determinada pelos contatos focais, que são complexos macromoleculares formados pelo agrupamento de integrinas ligadas a microfilamentos de actina (REICHARDT & TOMASELLI, 1991; FARWELL et al., 1995).

A LN afeta múltiplas funções biológicas, como a adesão celular, proliferação, migração, diferenciação, crescimento neurítico e metástase tumoral (FREIRE, 2000). No sistema nervoso em desenvolvimento a LN é encontrada ao longo das rotas de migração dos neuroblastos e ao longo dos tratos de fibras em crescimento (LIESI et al., 1995; LUCKENBILLEDDS, 1997; LETOURNEAU et al., 1988).

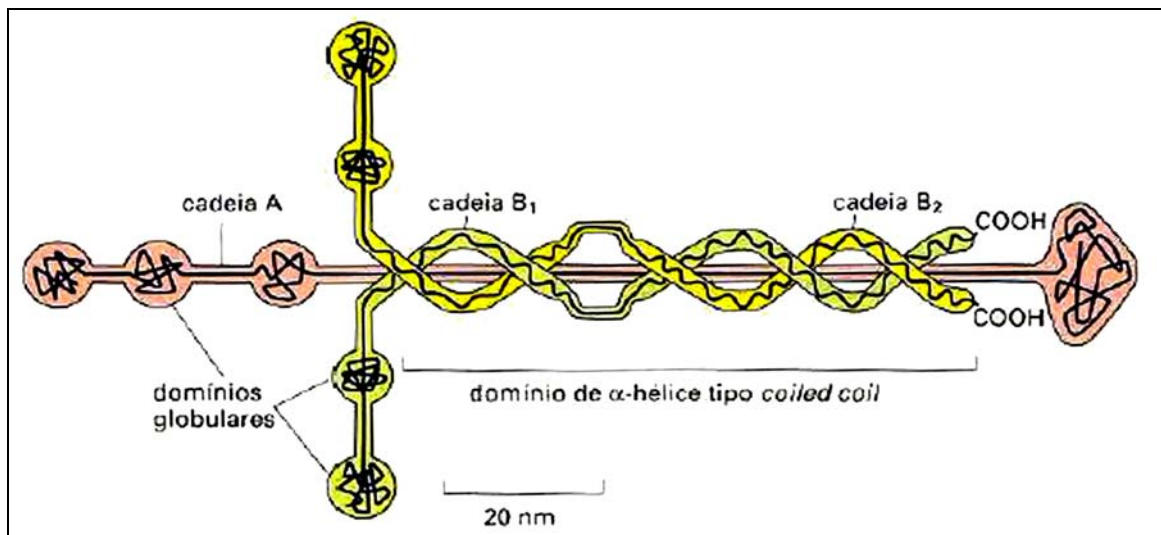


Figura 4: **Estrutura da Laminina**, adaptado de ALBERTS et al., 2002. LN é uma glicoproteína de aproximadamente 70 nm de comprimento, formada por uma cadeia α e por duas cadeias β .

1.2.2. Fibronectina:

A fibronectina (FN) é uma glicoproteína multifuncional encontrada na MEC, composta de duas subunidades unidas por pontes dissulfeto, próximas às extremidades C-terminal (Figura 5). Apresenta domínios específicos para ligação com outras proteínas de matriz, para glicosaminoglicanos e para integrinas (ZAGRIS, 2001). A organização da FN na MEC pode mediar adesão celular, afetar a morfologia, migração e diferenciação celular no SNC e diminuir a velocidade do cone de crescimento (STEWART & PEARLMAN, 1987; KUHN et al., 1995). Diversos estudos têm demonstrado que a associação de fatores de crescimento e FN pode regular a diferenciação (SERINI et al., 1998) e migração celular (NAGEL & WINKLBAUER, 1999) e que sinais intracelulares podem ser transmitidos para a rede de FN através das integrinas (WU et al., 1998).

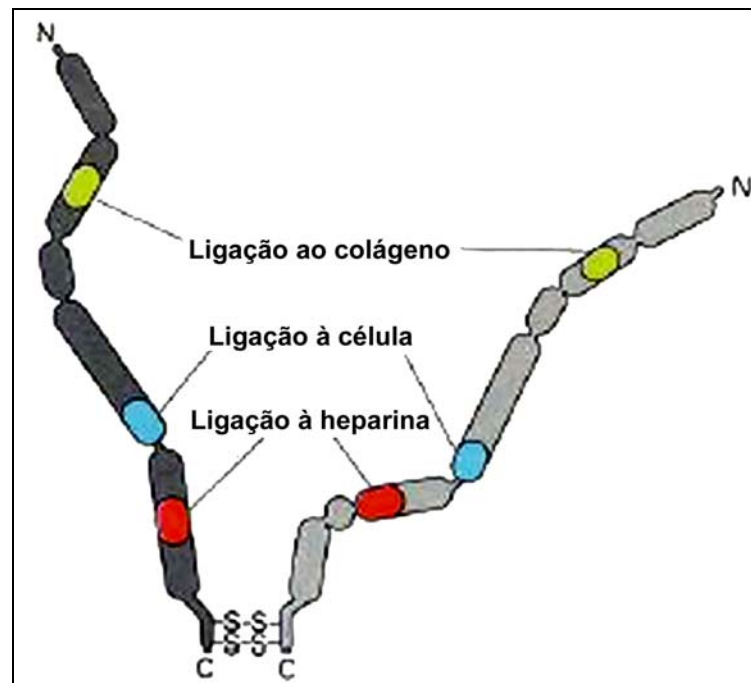


Figura 5: **Estrutura e sítios de ligação da Fibronectina**, adaptado de ALBERTS et al., 2002. FN é uma glicoproteína multifuncional encontrada na MEC, composta de duas subunidades unidas por pontes dissulfeto, próximas às extremidades C-terminal.

Na Figura 6 pode-se observar uma representação esquemática das integrinas, e a cascata de sinalização intracelular ativada pelas proteínas da MEC, LN e FN. A ligação dessas proteínas em seus receptores específicos, as integrinas, desencadeia alteração em proteínas do citoesqueleto e ativação da via das MAPKs, através da ativação da proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK). A cascata das MAPKs tem papel crucial em eventos envolvendo a proliferação celular, diferenciação e resposta ao estresse (DAVIS, 1993). Além da via das MAPKs, existem várias vias de sinalização que podem estar envolvidas com a modulação das proteínas de matriz, como as vias de sinalização da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) e proteína quinase C (PKC), as quais exercem importante regulação da reorganização da FN (LIN, 2002; YANG et al., 2002).

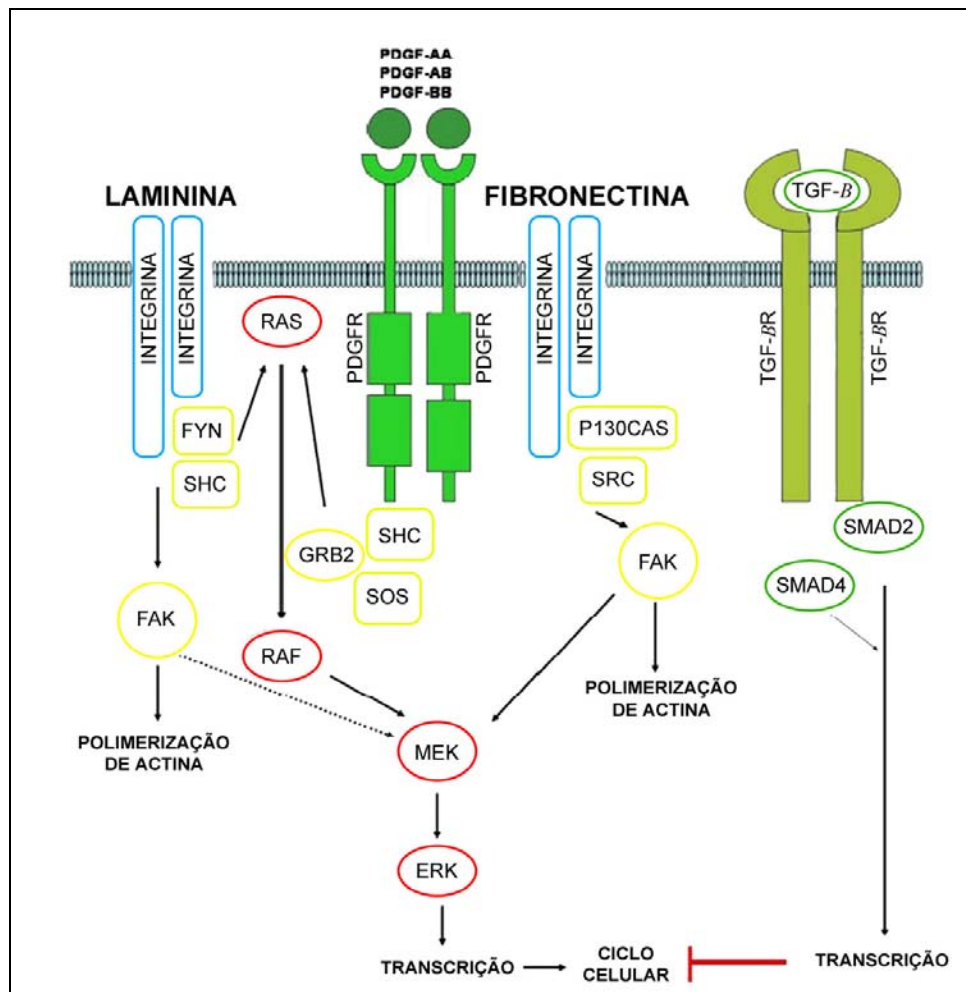


Figura 6: **Representação esquemática da cascata de sinalização intracelular ativada pela união de LN e FN em seus receptores específicos, as integrinas.** A ligação dessas proteínas nas integrinas desencadeia alteração em proteínas do citoesqueleto e ativação da via das MAPKs, através da ativação da ERK.

1.3. INTERAÇÃO NEURÔNIO-ASTRÓCITO

Durante o desenvolvimento do SNC de mamíferos, os astrócitos constituem o melhor substrato para a migração neuronal e o crescimento de axônios (RAKIC, 2003). Os astrócitos atuam na manutenção de um ambiente propício para os neurônios, através do tamponamento do potássio extracelular, que é aumentado pela atividade neuronal (KIMELBERG & NOREMBERG, 1989) e da recaptação de neurotransmissores da fenda sináptica (NEDERGAARD et al., 2002).

As interações entre neurônios e astrócitos podem ocorrer através da liberação de fatores solúveis, moléculas de sinalização celular e neurotransmissores, ou através de junções celulares do tipo “gap” (BARRES & BRADE, 2000; HAYDON, 2000). As junções do tipo “gap” podem regular o estabelecimento de conexões químicas e elétricas que por sua vez podem ser utilizadas para comunicações relativamente rápidas entre as células gliais e neurônios (HAYDON, 2000).

Fatores solúveis derivados da glia ou de neurônios são necessários para a maturação das sinapses no desenvolvimento *in vitro*, além de apresentarem um papel crucial no controle do número de neurônios e no crescimento de neuritos (PFRIEGER & BARRES, 1997; BIBEL & BARDE, 2000). Vários trabalhos têm demonstrado que não só as neurotrofinas, mas também a proteína S100 β , FGF, o fator de crescimento transformante (TGF) e o fator de crescimento epidérmico (EGF), potencialmente secretados pelos astrócitos, apresentam um papel importante na neurogênese (KANE et al., 1996; KUHN et al., 1997) e na neuritogênese (MARTINEZ & GOMES, 2002).

Neste estudo, avaliamos os efeitos dos DG em três diferentes situações. Primeiramente foi avaliado o efeito trófico de GMP ou GUO sobre astrócitos cerebelares

em cultura. Outro protocolo de cultura utilizado propiciou a análise da influência de fatores tróficos liberados no meio de cultura pelos astrócitos tratados com GMP ou GUO (meio condicionado) e seus efeitos sobre neurônios. E por fim, foi verificado o efeito direto dos DG sobre neurônios cerebelares em cultura.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel trófico dos nucleotídeos e nucleosídeo derivados da guanina em culturas de astrócitos e neurônios cerebelares de ratos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar a expressão das proteínas de matriz extracelular, laminina e fibronectina, em cultura de astrócitos cerebelares tratadas com GMP ou GUO;
2. Avaliar as vias de sinalização envolvidas na modulação induzida por GMP ou GUO sobre as proteínas de matriz extracelular de astrócitos;
3. Avaliar a neuritogênese e a viabilidade celular em cultura de neurônios granulares do cerebelo tratados com GMP ou GUO, e de neurônios granulares do cerebelo cultivados em meio condicionado proveniente de astrócitos tratados com GMP ou GUO.
4. Avaliar a adesão celular em cultura de neurônios granulares do cerebelo tratados com GMP ou GUO.
5. Avaliar os receptores e as vias de sinalização envolvida no aumento do número de neurônios induzido por GMP ou GUO.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Reagentes:

Ácido acético, ácido clorídrico, hidróxido de sódio e metanol foram adquiridos da Reagen.

Ácido bórico, película de Hyperfilmm, membrana de nitrocelulose 0,45 µm foram adquiridos da Amersham Pharmacia Biotech.

Albumina sérica bovina (BSA), anticorpo anti-bromodeoxiuridina (BrdU), anticorpo monoclonal anti-β-tubulina III, anticorpo monoclonal anti-proteína glial fibrilar ácida (GFAP), anticorpo policlonal anti-laminina, anticorpo secundário anti-IgG de coelho Cy3, anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), Dipiridamol, entelan, 8-Fenil-teofilina (8-PT), glicerol, L-glutamato, glutamina, guanosina 5'-monofosfato (GMP), guanosina (GUO), γ-D-glutamilamino-metilulfonato (GAMS), H-89, Hoescht 33342, n-propil-galacto-glicerol, PD 98059, poli-ornitina, soro normal de cabra (NGS), (+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo(a,b)ciclohepteno-5,10-imina (MK-801), duodecil sulfato de sódio (SDS) e tripsina foram adquiridos da Sigma.

Anticorpo policlonal anti-fibronectina foi adquirido da Dako.

Anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase foi adquirido da Invitrogen.

Cloreto de potássio, cloreto de sódio, fosfato de potássio, fosfato de sódio dibásico, meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM/F12), meio NeurobasalTM, soro fetal bovino (FBS) foram adquiridos da Gibco.

DPCPX (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine) foi obtido da Tocris Cookson (Bristol, UK) e ZM 241385 foi obtido da Tocris Cookson (USA).

Quelerequina, KN-62, Wortmanina foram obtidos da Alomone labs.

Filmes fotográficos, soluções reveladora e fixadora foram obtidos da KODAK.

Garrafas para cultura de células e placas de 24 poços foram adquiridas da Biosystems.

Glicose foi adquirida da Merck.

Kit de revelação do anticorpo conjugado à peroxidase VIP foi adquirido da VECTOR.

Paraformaldeído foi adquirido da Vetec.

Ponceau e Tween-20 foram obtidos da USB.

3.1.2. Equipamentos:

Aagitador magnético, Q-221-2 – Quimis.

Banho-maria, dbm 120 – Benfer.

Câmara de Neubauer, Hirschmann Techcolor.

Centrífuga, VI – Continental.

Centrífuga, 5415 D – Eppendorf.

Cuba de eletroforese - Amersham Pharmacia Biotech.

Cuba de eletrotransferência - Amersham Pharmacia Biotech.

Espectrofotômetro – Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech.

Estufa úmida de CO₂, Nuaire.

Fluxo laminar, Veeco.

Microscópio de fluorescência, modelo Elipse TE300, Nikon.

Microscópio de fluorescência, Zeiss.

Potenciômetro – DM20, Digimed.

Software Sigma Scan Pro, Jandel Scientific.

3.2. ANIMAIS:

Ratos Wistar de 1 a 3 dias (P1-P3) ou 7 a 10 dias pós-natal (P7-P10), de ambos os sexos foram utilizados para as culturas de células. Fêmeas prenhas foram obtidas do Biotério Central da UFSC ou do Departamento de Anatomia – CCS - UFRJ, e mantidas em ciclo claro/escuro de 12 horas, a 25°C, com ração e água *ad libitum*. Os “Princípios Éticos do COBEA” foram seguidos para todos os experimentos. O protocolo de pesquisa foi aprovado pela CEUA/UFSC.

3.3. CULTURAS DE CÉLULAS:

3.3.1. Astrócitos – As culturas primárias de astrócitos foram preparadas a partir do cerebelo de ratos neonatos (1 a 3 dias), conforme a metodologia utilizada por TRENTIN et al. (1995). Em cada preparação, cerebelos de seis animais foram dissecados em placas de Petri, contendo solução salina tamponada por fosfato com 33 mM de glicose (PBS-glicose). Após dissociação mecânica com pipeta Pasteur, as células foram centrifugadas, semeadas na densidade de $1,5 \times 10^5$ células/poço em placas com 24 poços, preparadas com poli-

ornitina (10 $\mu\text{g/mL}$) uma hora antes de as células serem semeadas. As células foram cultivadas em meio DMEM-F12 com 10 % de FBS e mantidas em estufa 37° C em atmosfera umidificada de 95% ar e 5% CO₂. O meio de cultura foi trocado após 24 horas da semeadura, e de dois em dois dias.

3.3.2. Neurônios – As culturas de neurônios granulares do cerebelo foram preparadas conforme descrito por THANGNIPON et al. (1983), a partir de ratos Wistar de 7 a 10 dias pós-natal. Os cerebelos dissecados foram incubados com solução de 2,5 % de tripsina por 10 minutos a 37° C e dissociados mecanicamente na presença de 10 % de FBS (inibidor de tripsina). As células foram semeadas na densidade de 5×10^4 células/poço em meio Neurobasal acrescido do suplemento B27, ou cultivados em meio condicionado de astrócitos pré-tratados com DG, em placas de 24 poços sobre uma camada de poli-ornitina e mantidas por 24h em estufa a 37°C em atmosfera umidificada de 95% ar e 5% de CO₂.

3.4. TRATAMENTO DAS CULTURAS:

3.4.1. Astrócitos – Após atingir a confluência (aproximadamente 7-10 dias em cultura), os astrócitos foram tratados por 24 horas com GMP ou GUO (1 μM , 100 μM ou 1 mM).

3.4.2. Preparação do meio condicionado - Após atingir a confluência, os astrócitos foram tratados por 24 horas com GMP ou GUO (1 μM , 100 μM ou 1 mM), o meio substituído por D-MEM F12 sem soro e mantido por mais 24 horas.

3.4.3. Neurônios – Os neurônios granulares do cerebelo foram cultivados em meio Neurobasal acrescido do suplemento B27 e tratados por 24 horas com GMP ou GUO (1 μ M, 100 μ M ou 1 mM), ou cultivados em meio condicionado de astrócitos pré-tratados com GMP ou GUO (1 μ M, 100 μ M ou 1 mM).

3.5. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR:

3.5.1. Método de redução do MTT: A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium brometo = Thiazolyl blue). O MTT é um sal de tetrazolium solúvel em água, que é convertido em um formazam púrpura após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (Jacobsson & Fowler, 1999). Após o período de incubação com GMP ou GUO, as células foram incubadas com MTT 2,5 mg/mL e mantidas por 2 horas. Após, o meio foi removido e as células foram solubilizadas com 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO). A viabilidade celular é proporcional à leitura da absorbância medida em um leitor de Elisa (550 nm).

3.5.2. Detecção de apoptose: Os eventos que caracterizam a apoptose foram avaliados pela fragmentação da cromatina, através da utilização do corante HOESCHT 33342 que permite a visualização nuclear (NEGRI et al., 1997). As células foram cultivadas em lamínulas de vidro e após o tratamento com GMP ou GUO, o meio de cultura foi removido, o corante foi adicionado (5 μ g/mL) e as placas incubadas por 30 minutos a 37°C. As células foram lavadas duas vezes com PBS e observadas em microscópio de fluorescência Elipse TE300, Nikon (emissão a 465 nm e excitação a 355 nm). A partir do total de células contadas (no

aumento de 60x) foram determinados o número de células com núcleo picnótico, para quantificar a porcentagem de células com características apoptóticas.

3.5.3. Contagem do número de células: a avaliação do número de células foi realizada através da contagem dos núcleos, utilizando o corante HOESCHT 33342. As células foram cultivadas em lamínulas de vidro e após o tratamento com GMP ou GUO, na presença ou ausência de antagonistas de receptores adenosinérgicos ou glutamatérgicos, ou inibidores de proteínas quinases, o meio de cultura foi removido, o corante foi adicionado (5 µg/mL) e as placas incubadas por 30 minutos a 37°C. As células foram lavadas duas vezes com PBS e observadas em microscópio de fluorescência Elipse TE300, Nikon (emissão a 465 nm e excitação a 355 nm). Os antagonistas utilizados foram os seguintes: ZM 241385, antagonista específico do receptor A_{2A} de adenosina, 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX), antagonista específico do receptor A₁ de adenosina, 8-fenil-teofilina (8-PT), antagonista inespecífico dos receptores de adenosina, (+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo(a,b)ciclohepteno-5,10-imina (MK-801), antagonista não-competitivo do receptor NMDA, e γ-D-glutamilamino-metilulfonato (GAMS), antagonista do receptor cainato. Os inibidores utilizados foram os seguintes: PD 98059, inibidor seletivo da MEK (proteína quinase quinase ativada por mitógeno); KN-62, inibidor específico da CaM-KII (proteína quinase II dependente de cálcio-calmodulina); queleretrina, inibidor específico da PKC (proteína quinase C), wortmanina, inibidor específico da PI3-K (proteína quinase 3-fosfoinositol) e H-89, inibidor específico da PKA (proteína quinase dependente de AMPc), dipiridamol (DIP) (inibidor do transporte de nucleosídeos). Agradeço ao Professor Dr.

Adair R. S. dos Santos por ter cedido gentilmente o antagonista específico do receptor A₁ de adenosina, DPCPX.

3.6. IMUNOCITOQUÍMICA:

3.6.1. Fixação das células - Os astrócitos foram fixados com 4 % de paraformaldeído por 30 minutos a temperatura ambiente e as células foram permeabilizadas com 0,2 % de Triton X-100 por 15 minutos. Para detecção por imunocitoquímica contra as proteínas de matriz extracelular, laminina e fibronectina, as células não foram permeabilizadas. Sítios inespecíficos de ligação dos anticorpos foram bloqueados pela incubação das células com 5% de BSA diluída em PBS por 30 minutos.

3.6.2. Imunomarcação da GFAP – Depois de fixadas, as células foram incubadas por 12h, a 4° C, em câmara úmida, com anticorpo primário anti-GFAP de camundongo (diluição de 1:500) e em seguida incubadas por 1 h com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (diluição de 1:400), à temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS as células foram incubadas para co-marcação com Hoescht 33342 (5 µg/mL), por 5 minutos, temperatura ambiente, para análise do número total de células. As lâminas foram montadas com n-propilgalactosídeo, analisadas e fotografadas em microscópio de fluorescência.

3.6.3. Imunomarcação de Fibronectina e Laminina – Depois de fixadas, as células foram incubadas por 12h, a 4° C, em câmara úmida, com anticorpo primário de coelho anti-fibronectina humana (diluição de 1:400) ou anti-laminina de camundongo (diluição de

1:30) e em seguida incubadas por 1 h com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à rodamina (Cy3) (1:5000), à temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS as células foram incubadas para co-marcação com HOESCHT 33342 (5 µg/mL), por 5 minutos, à temperatura ambiente. As lâminas foram montadas com n-propilgalactosídeo, analisadas e fotografadas com microscópio de fluorescência.

3.6.4. Imunomarcacão de β -tubulina III – Depois de fixadas, as células foram incubadas por 12h com anticorpo primário de camundongo anti- β -tubulina III humana (diluição de 1:400) a 4° C, em câmara úmida, e em seguida incubadas por 1 h com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (diluição de 1:200), à temperatura ambiente. A revelação foi realizada com um Kit específico VIP. As lâminas foram montadas com entelan após desidratação com banho de álcool absoluto.

3.6.5. Avaliacão de vias de sinalizacão - Os astrócitos foram tratados com inibidores específicos de vias de sinalizacão por 30 minutos em meio de cultura DMEM-F12 sem soro e então incubados concomitantemente com GUO 100 µM por 24 horas, para posterior imunomarcacão com anticorpo anti-fibronectina. Os inibidores utilizados foram os seguintes: PD 98059, KN-62, queleretrina, wortmanina, e H-89. Agradeço ao Professor Dr. Nelson H. Gabilan por ter cedido gentilmente o inibidor da proteína PKA, H-89.

3.7. IMUNODETECCÃO DE PROTEÍNAS

3.7.1. Preparacão da amostras: As proteínas de matriz extracelular, fibronectina e laminina, foram detectadas pelo método de “Westernblot”. Após o tratamento, os astrócitos

foram solubilizados em tampão de extração de proteínas contendo 4 % SDS, 2 mM EDTA, 8% β -mercaptoetanol, e 50 mM Tris (pH 6.8).

3.7.2. Separação de proteínas: As proteínas (50 μ g/poço) foram separadas por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS), utilizando gel de separação de acrilamida 6,5%, e gel de entrada 4% (BUNN et al., 1995). A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 40 mA e voltagem máxima de 140 mV (para 2 géis) durante aproximadamente 2 horas. Após a corrida, os géis foram submetidos a eletrotransferência.

3.7.3. Eletrotransferência e imunodeteccção: As proteínas foram transferidas do gel de eletroforese para uma membrana de nitrocelulose (poro 0,45 μ m) (1,5 hora a 4 °C, 350 mA). Após a eletrotransferência, as membranas foram bloqueadas por 1 h com leite desnatado 5% em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) e a seguir lavadas com TBS-T (Tween-20 0,05 %, Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). Um segundo bloqueio por 1 hora foi realizado usando gelatina 1,5 % em TBS, seguido de lavagem em TBS-T (Baldo, 1994; Collins & Sim, 1998). Finalmente as membranas foram incubadas com os anticorpos específicos anti-fibronectina ou anti-laminina (1:5000 e 1:2000, respectivamente). Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário específico anti-rabbit 1:2000 (ligado à peroxidase) e após lavagens, foram reveladas em filme autoradiográfico após a emissão de quimioluminescência induzida por reagentes adicionados a membrana de nitrocelulose (Kit ECL), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.8. MORFOMETRIA

Imagens de neurônios marcados com anticorpo anti- β -tubulina III foram capturadas a partir de um sistema de captura de imagens acoplado a um microscópio de fluorescência . O número de neuritos por neurônios, a medida do comprimento total dos neuritos e o número total de neurônios foi analisado utilizando-se o software Sigma Scan Pro (Jandel Scientific). Três experimentos independentes foram realizados em triplicata e aproximadamente 100 neurônios por poço foram selecionados em cinco campos escolhidos aleatoriamente para análise. A análise estatística dos dados morfométricos foi realizada utilizando o programa SPSS 10.0 for Windows.

3.9. ENSAIO DE ADESÃO CELULAR:

Os neurônios granulares do cerebelo foram cultivados por 12 ou 24 horas em meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO. Após este período o meio de cultura foi removido e as células foram incubadas por 5, 15 ou 30 minutos em PBS suplementado com 2 mM de ácido etileno dinitrilo tetra acético (EDTA). O EDTA tem a função de quelar íons divalentes (Ca^{++} e Mg^{++}) induzindo o desprendimento das células de seu substrato de poli-ornitina na placa de cultura. Após este período de incubação o meio sobrenadante foi coletado e as células desprendidas foram contadas em câmara de Neubauer para avaliação do número total de células.

3.10. DOSAGEM DE PROTEÍNAS:

O conteúdo proteico das células foi determinado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Foi utilizado BSA como padrão.

3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os resultados foram analisados através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Duncan, quando necessário. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DOS ASTRÓCITOS APÓS TRATAMENTO COM GMP OU GUO

Para investigar os efeitos do GMP e da GUO sobre a morfologia astrocitária, os astrócitos foram tratados com 1 μ M, 100 μ M ou 1 mM de GMP ou GUO por 24h, fixados e imunomarcados para a proteína GFAP. A proteína de citoesqueleto GFAP é considerada um marcador astrocitário, pois consiste na majoritária proteína de filamentos intermediários, encontrada no citoplasma de astrócitos (ENG, 1985; KIMELBERG & NOREMBERG, 1985; DAHL, 1992; LEFRANÇOIS et al., 1997; MENET et al., 2001).

Observou-se que após o tratamento dos astrócitos com GMP ou GUO a marcação para GFAP nas células tratadas com GMP ou GUO permaneceu semelhante ao grupo controle (Figura 7), o que indica que não há modulação do nível de expressão desta proteína, sugerindo que a morfologia astrocitária não é alterada após tratamento com DG.

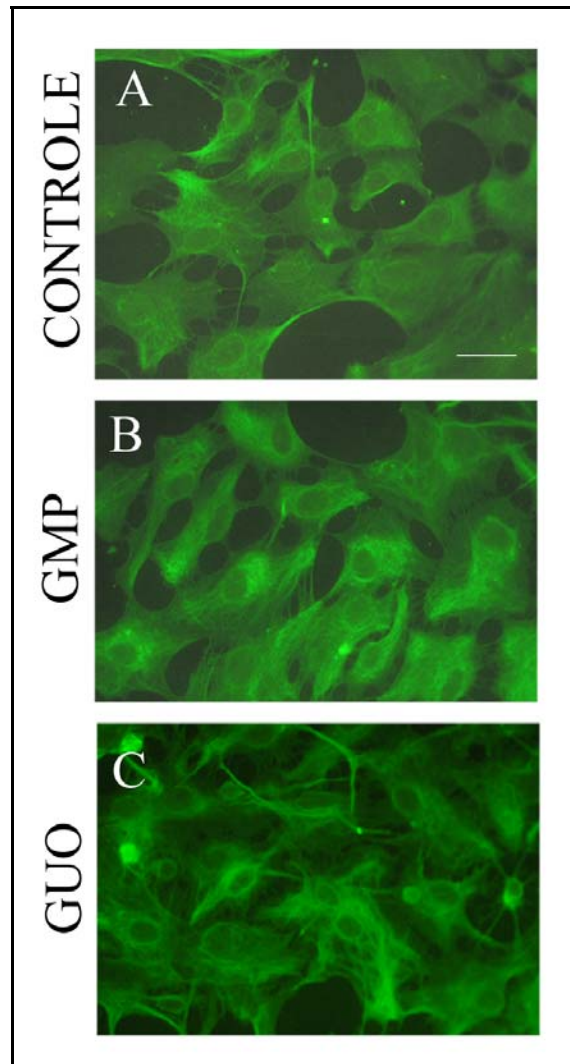


Figura 7: Avaliação da morfologia astrocitária após o tratamento com GMP ou GUO.

Os astrócitos cerebelares foram tratados com GMP ou GUO (1 μ M, 100 μ M ou 1 mM) por 24h, fixados e imunomarcados para GFAP. (A) Controle; (B) GMP 100 μ M; (C) GUO 100 μ M. As imagens são fotomicrografias representativas de 3 experimentos realizados em triplicata. Barra = 20 μ m.

4.2. PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)

Os astrócitos são os principais produtores dos componentes da MEC, incluindo as proteínas laminina e fibronectina, *in vivo* e *in vitro* (GARCIA-ABREU et al., 1995; PALU & LIESI, 2002). O padrão de organização dessas proteínas na superfície dos astrócitos proporciona um melhor substrato de adesão aos neurônios, além de estar envolvido no crescimento neurítico. Em resultados anteriores do nosso laboratório, foi demonstrado que GMP ou GUO modulam a organização da laminina e fibronectina (FRANCISCO, 2004). Na situação controle observou-se uma marcação pouco intensa e com distribuição puntual enquanto que nos astrócitos tratados com GMP ou GUO a marcação das proteínas da MEC apresentou-se mais evidente, com organização fibrilar, indicando uma maior complexidade na MEC (Figura 8) (FRANCISCO, 2004).

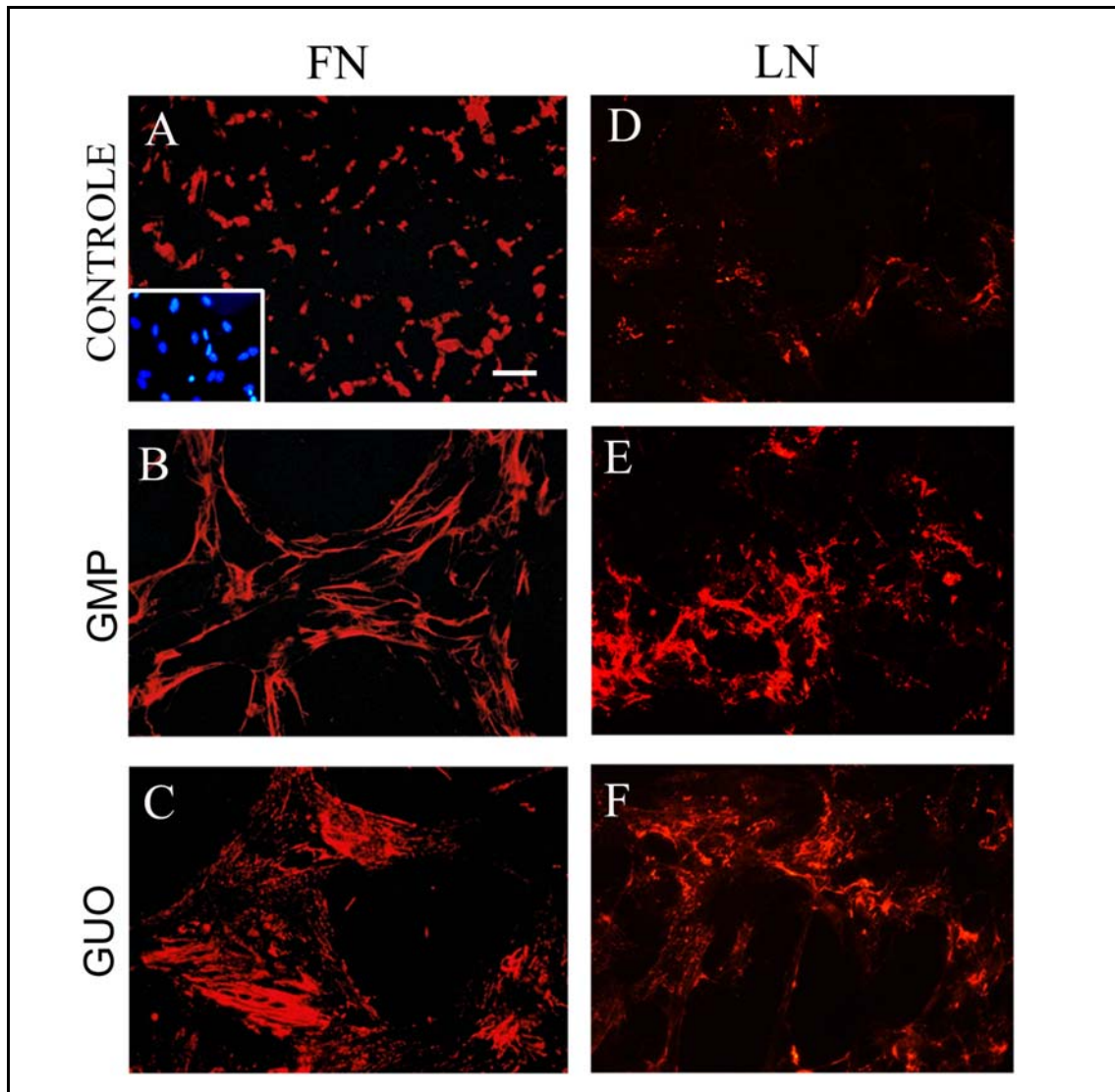


Figura 8: Efeito do tratamento de astrócitos com GMP ou GUO por 24h, sobre a organização da fibronectina e laminina. Os astrócitos cerebelares foram tratados com 100 μ M de GMP ou GUO por 24h, fixados e imunomarcados para (A-C) fibronectina ou (D-F) laminina. (A) Controle; (B e E) 100 μ M de GMP, (C e F) 100 μ M de GUO. Barra = 20 μ m.

4.2.1. Avaliação da Expressão das Proteínas da MEC

Com o intuito de verificar se, além da modulação da organização das proteínas da MEC, há um aumento na expressão destas proteínas, os astrócitos cerebelares foram tratados com GMP ou GUO (1 μ M, 100 μ M ou 1 mM) por 24h.

As Figuras 9 e 10 mostram que a expressão astrocitária da fibronectina e laminina não foi alterada após o tratamento dos astrócitos com GMP ou GUO em nenhuma das concentrações utilizadas.

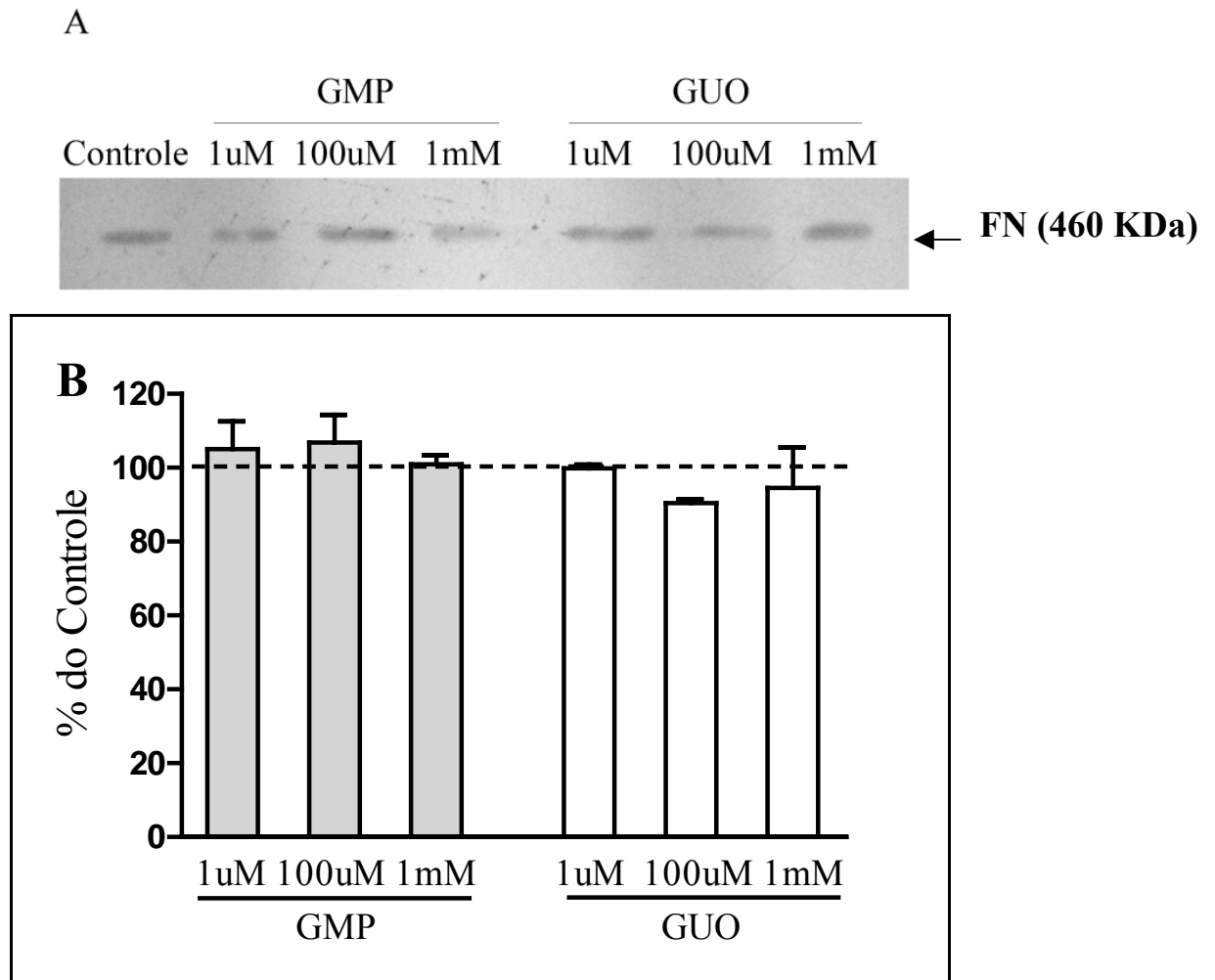


Figura 9: **Avaliação da expressão da fibronectina em astrócitos tratados com GMP ou GUO.** Após o tratamento dos astrócitos cerebelares com GMP ou GUO (1 μ M, 100 μ M ou 1 mM) realizou-se a imunodeteção da proteína fibronectina. (A) Immunoblotting representativo; (B) Análise quantitativa expressa como porcentagem do controle (100%). Os valores representam a média \pm erro padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

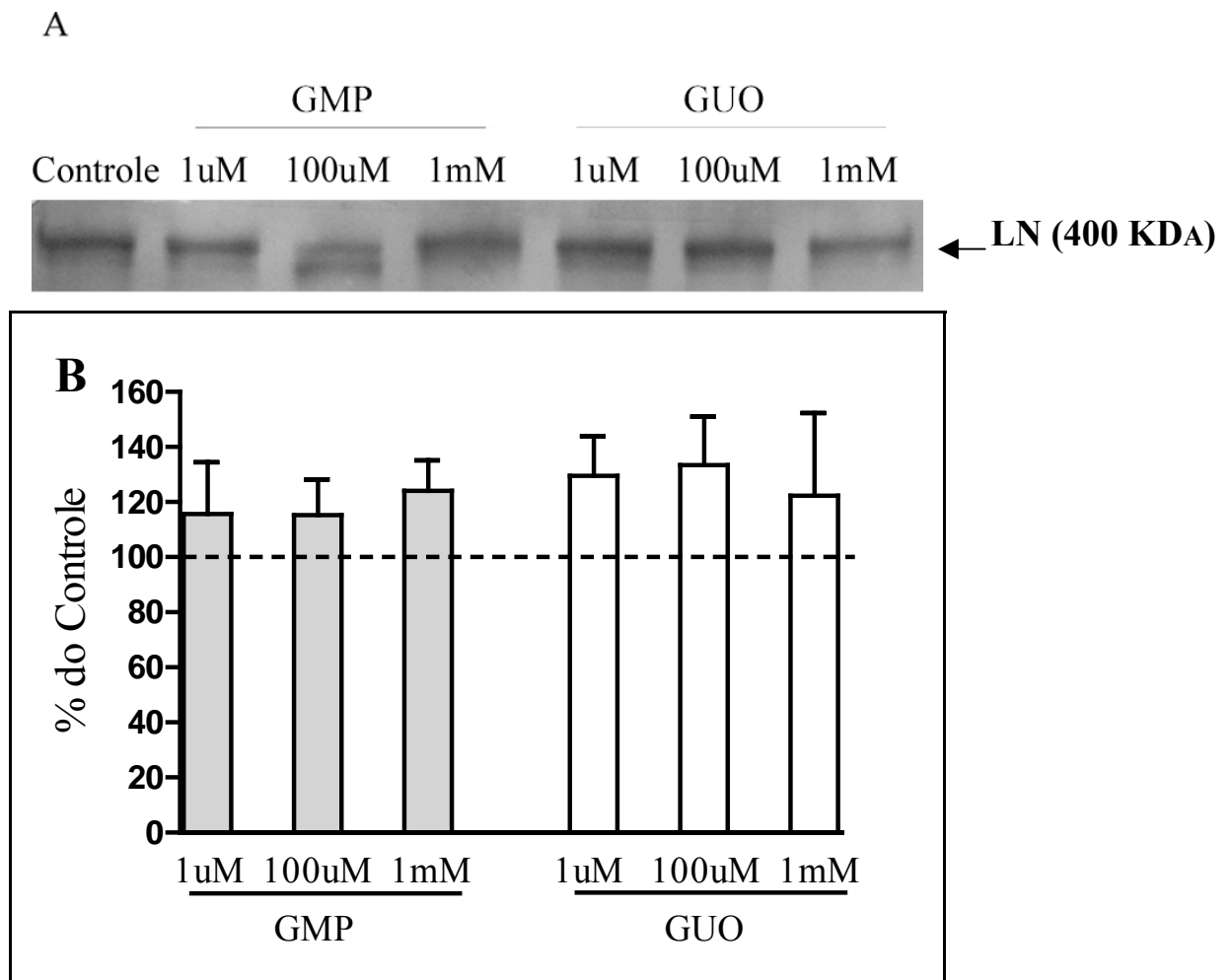


Figura 10: **Avaliação da expressão da laminina em astrócitos tratados com GMP ou GUO.** Após o tratamento dos astrócitos cerebelares com GMP ou GUO (1 μ M, 100 μ M ou 1 mM) realizou-se a imunodeteção da proteína laminina. (A) Immunoblotting representativo; (B) Análise quantitativa expressa como porcentagem do controle (100%). Os valores representam a média \pm erro padrão de 3 experimentos realizados em triplicata.

4.2.2. Avaliação das vias de sinalização celular envolvidas na modulação das proteínas da MEC

Para investigar o envolvimento das moléculas de sinalização celular envolvidas na reorganização das proteínas da MEC induzida por DG, os astrócitos cerebelares foram tratados por 24h com GUO (100 μ M) na presença de inibidores específicos de proteínas quinases. Como mostra a Figura 11, GUO modificou a organização da fibronectina nos astrócitos, quando comparado com o controle. A adição de 50 μ M de PD 98059, inibidor da proteína MEK, preveniu o efeito induzido por GUO (Figura 11 G). Resultados similares foram observados no tratamento com 10 μ M de KN-62, inibidor da proteína CaMKII (Figura 11 H), e 10 μ M de queleritrina, inibidor da proteína PKC (Figura 11 I). Contudo a adição de 1 μ M de wortmanina, inibidor da proteína PI3-K (Figura 11 J), não teve efeito na reorganização das proteínas da MEC induzida por GUO. Os inibidores utilizados não tiveram efeito *per se*.

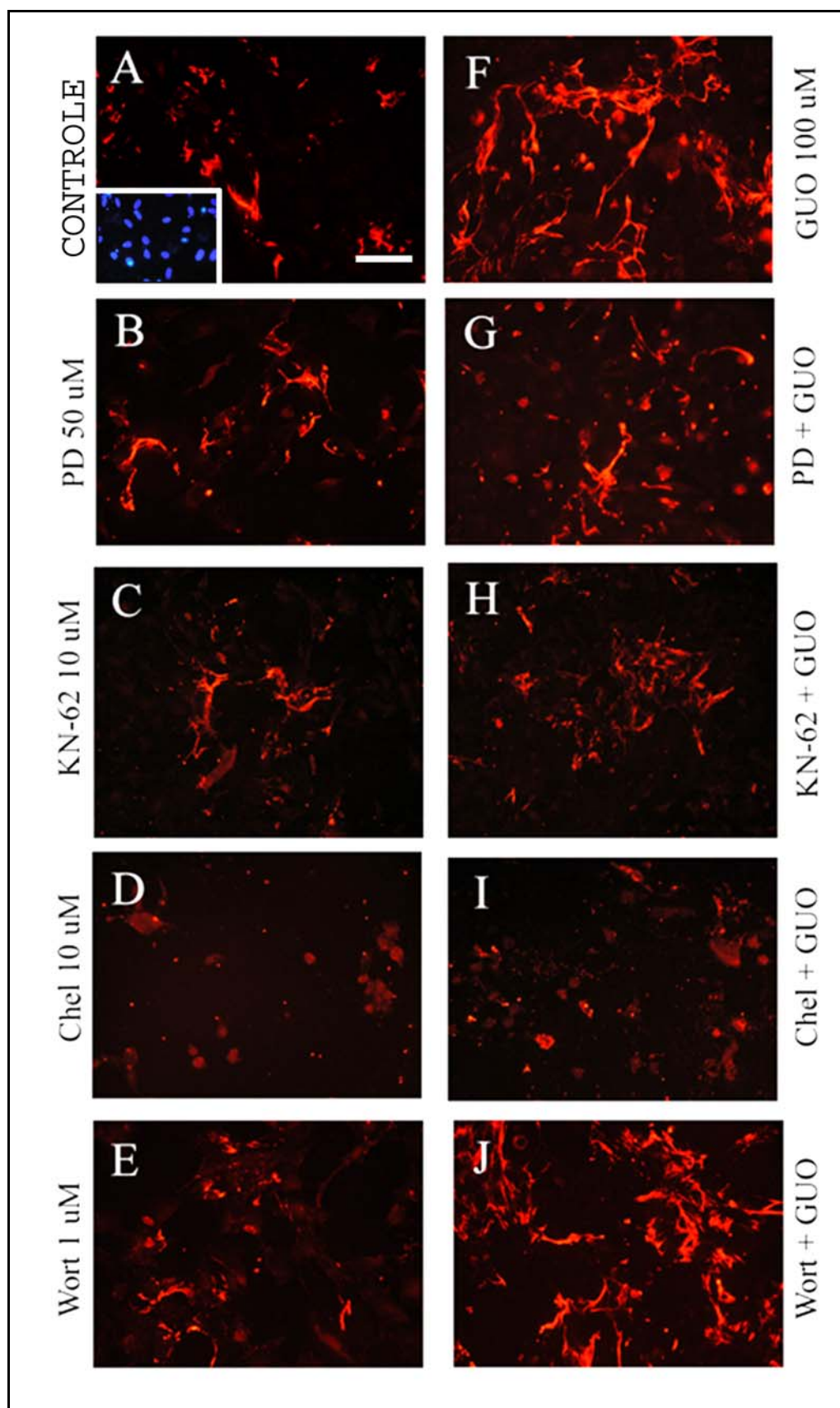


Figura 11: Efeito de inibidores de proteínas quinases na reorganização da fibronectina induzida por GUO em astrócitos. Os astrócitos foram tratados com GUO (100 μ M) por 24h, na presença de inibidores específicos de proteínas quinases MEK, CaMKII, PKC e PI3-K. Após o tratamento, os astrócitos foram fixados e imunomarcados para fibronectina. (A) Controle; (B) PD 98059 (PD, 50 μ M); (C) KN-62 (KN-62, 10 μ M); (D) Queleretrina (CHEL, 10 μ M); (E) Wortmanina (WORT, 1 μ M); (F) GUO 100 μ M; (G) PD + GUO; (H) K-62 + GUO 100 μ M; (I) CHEL + GUO; (J) WORT + GUO. As imagens são fotomicrografias representativas de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. Barra = 20 μ m.

4.3. O EFEITO DO MEIO CONDICIONADO DE ASTRÓCITOS TRATADOS COM GMP OU GUO SOBRE NEURÔNIOS EM CULTURA

Resultados prévios do nosso laboratório revelaram que o pré-tratamento dos astrócitos com GMP ou GUO aumenta o número de neurônios em co-cultura (FRANCISCO, 2004). Para discriminar se o efeito de GMP e GUO sobre o aumento de neurônios cerebelares em cultura é uma ação direta ou indireta (via astrócitos), os neurônios granulares do cerebelo foram cultivados em meio condicionado de astrócitos tratados por 24 horas com GMP ou GUO, ou em meio Neurobasal em presença de GMP ou GUO.

4.3.1. O efeito do meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO sobre o número de neurônios

Os neurônios granulares foram cultivados em meio condicionado de astrócitos tratados com GMP e GUO por 24 horas, foram fixados e a imunocitoquímica para a proteína β -tubulina III foi realizada para realizar a contagem do número total dos neurônios. Na Figura 12, observa-se a diferença entre o número de neurônios encontrados na situação controle (neurônios cultivados em meio condicionado de astrócitos não tratados com GMP ou GUO) e nos tratamentos. Este aumento no número de neurônios corresponde a 61 %, 46 % e 108 % quando os neurônios são cultivados em meio condicionado de astrócitos tratados com 1 μ M, 100 μ M ou 1 mM de GMP, respectivamente; e a 75 %, 136 % e 134 % quando os neurônios são cultivados em meio condicionado de astrócitos tratados com 1 μ M, 100 μ M ou 1 mM de GUO; respectivamente.

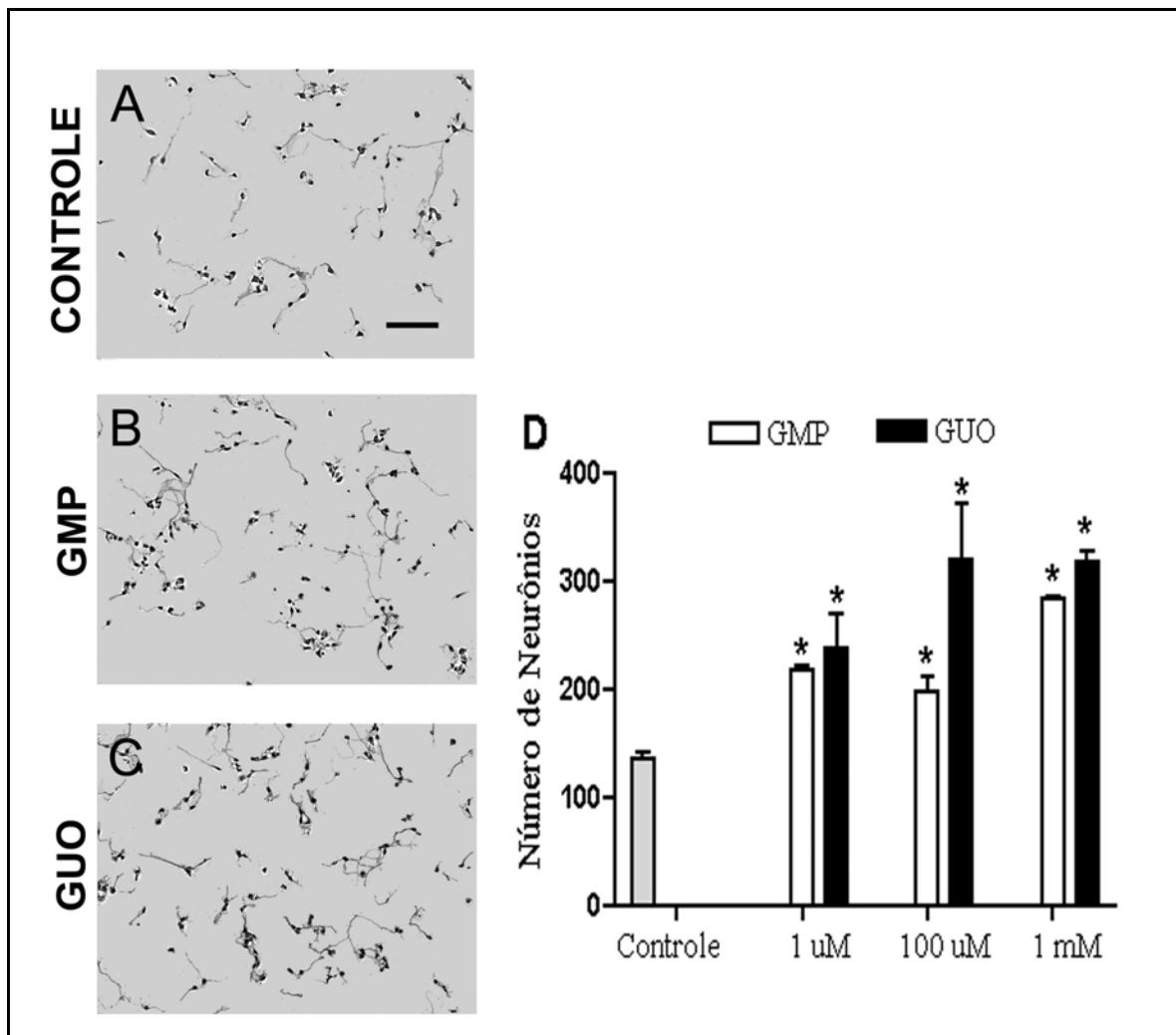


Figura 12: **Meio Condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO aumenta o número de neurônios granulares do cerebelo.** Neurônios granulares obtidos de ratos P7 foram cultivados por 24h (A) em meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO (1 μ M, 100 μ M, B e C ou 1 mM). O número total de neurônios (D) foi obtido pela contagem do número de corpos celulares positivos para a proteína β -tubulina III, de três experimentos independentes realizados em triplicata. Diferença significativa foi observada em todos os tratamentos quando comparado ao controle (neurônios cultivados em meio condicionado de astrócitos não tratados com GMP ou GUO) (* $p < 0,05$). Barra = 20 μ m.

4.3.2. O efeito do meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO sobre o crescimento neurítico

A avaliação de neuritogênese foi realizada após imunomarcagem dos neurônios com a proteína β -tubulina III. Na Tabela 1 observa-se que na cultura de neurônios realizada na presença de meio de condicionado de astrócitos tratados com 1 μ M, 100 μ M ou 1 mM de GMP ou GUO por 24 h, não houve alteração no número de neuritos por neurônio, na distribuição dos neuritos classificados pelo comprimento ou no comprimento total dos neuritos.

Tabela 1. O cultivo de neurônios granulares do cerebelo em meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO não altera a neuritogênese.

Distribuição dos neuritos por comprimento (μm)	Controle	GMP			GUO		
		1 μM	100 μM	1 mM	1 μM	100 μM	1 mM
		% neurônios					
0 - 50	32,7 ± 14,0	45,3 ± 10,0	47,9 ± 1,0	54,7 ± 0,0	53,7 ± 5,0	53,3 ± 4,0	55,9 ± 0,0
50 - 100	38,4 ± 2,0	25,3 ± 0,3	35,9 ± 3,0	31,1 ± 0,0	29,4 ± 4,0	31,9 ± 2,0	36,6 ± 0,0
100 - 200	22,7 ± 6,0	25,3 ± 7,0	14,7 ± 0,5	13,2 ± 0,0	16,6 ± 0,2	14,8 ± 6,0	5,4 ± 0,0
> 200	6,3 ± 6,0	4,3 ± 3,0	1,7 ± 1,0	0,9 ± 0,0	0,4 ± 0,4	0,0 ± 0,0	2,2 ± 0,0
Comprimento Total de Neuritos (μm)	71,1 ± 18,6	58,9 ± 10,2	51,5 ± 0,4	44,3 ± 0,0	40,82 ± 5,9	41,0 ± 3,5	43,2 ± 0,0
Neuritos/ Neurônio	Controle	GMP			GUO		
		1 μM	100 μM	1 mM	1 μM	100 μM	1 mM
		% neurônios					
0	22,5 ± 2,0	27,0 ± 4,0	19,4 ± 2,0	23,8 ± 0,0	28,6± 7,0	17,6 ± 4,0	23,2 ± 0,0
1	70,6 ± 4,0	66,8 ± 5,0	67,8 ± 3,0	63,6 ± 0,0	70,7± 9,0	68,8 ± 3,0	72,8 ± 0,0
2	7,3 ± 0,3	8,4 ± 1,0	12,8 ± 0,9	12,6 ± 0,0	7,4 ± 2,0	9,6 ± 1,0	2,4 ± 0,0
3 ou +	1,9 ± 0,7	1,7 ± 2,0	2,4 ± 2,0	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,5	0,4 ± 0,4	1,6 ± 0,0

Neurônios cerebelares obtidos de ratos P7 foram cultivados por 24h em meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO. Após 24h de cultura, o comprimento dos neuritos e o número de neuritos por neurônio foram avaliados utilizando o Software Sigma Scan Pro (Jandel Scientific). Para todas as análises verificou-se no mínimo 100 neurônios de três experimentos independentes realizados em triplicata, e em nenhum grupo foi verificada diferença significativa quando comparado ao controle.

4.3.3. O efeito do meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO sobre a viabilidade neuronal

Para investigar se o efeito do GMP ou GUO sobre o número de neurônios foi promovido pelo aumento da sobrevida neuronal, foi determinada a viabilidade celular através da técnica de redução do MTT.

Como mostra a Figura 13, o meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO (1 μ M, 100 μ M ou 1 mM) não alterou o número de neurônios viáveis, o que demonstra que o aumento no número de neurônios não foi decorrente do aumento da sobrevida neuronal.

Também foi avaliado o efeito do meio condicionado de astrócitos sobre a indução de apoptose em neurônios granulares do cerebelo, corando as células com HOESCHT 33342 (5 μ g/mL) e contando os núcleos picnóticos. Imagens de microscopia de fluorescência de neurônios corados com HOESCHT 33342, após 24h de cultivo em meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO podem ser observadas na Figura 14. A análise quantitativa pode ser observada na Figura 15, onde um pequeno número de células apoptóticas é encontrado em todos os tratamentos.

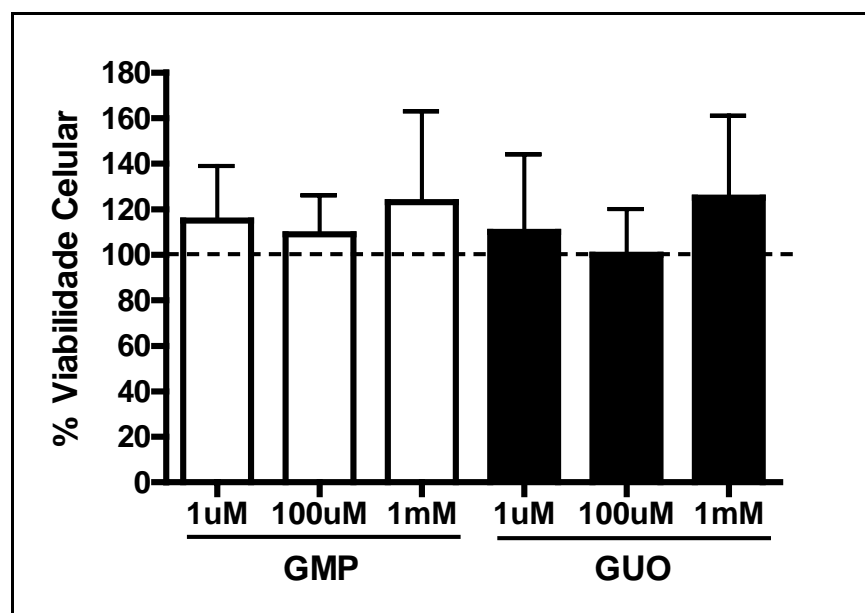


Figura 13: **Avaliação da viabilidade celular em neurônios granulares do cerebelo cultivados em meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO.** Neurônios cerebelares obtidos de ratos P7 foram cultivados por 24h em meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO (1 μ M, 100 μ M ou 1 mM). A viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do MTT. Os valores representam a média \pm erro padrão de quatro experimentos independentes realizados em triplicata.

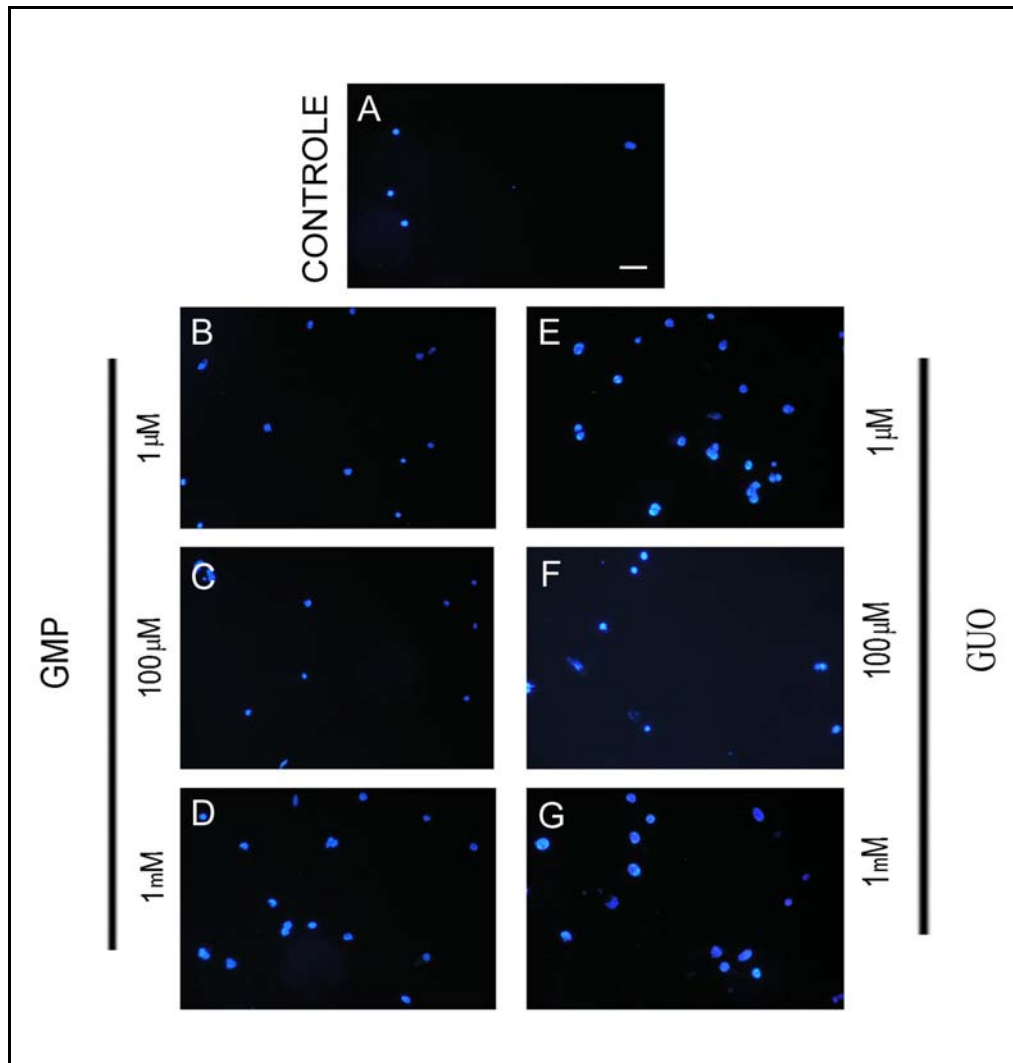


Figura 14: **Imagens de microscopia de fluorescência de neurônios corados com HOESCHT 33342, após 24h de cultivo em meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO.** Neurônios cerebelares obtidos de ratos P7 foram cultivados por 24h (controle, A) em meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO (1 μ M, 100 μ M ou 1 mM) (B-G). Após o tratamento, as células foram coradas com HOESCHT 33342 (5 μ g/mL) e os núcleos picnóticos foram contados. Barra = 20 μ m.

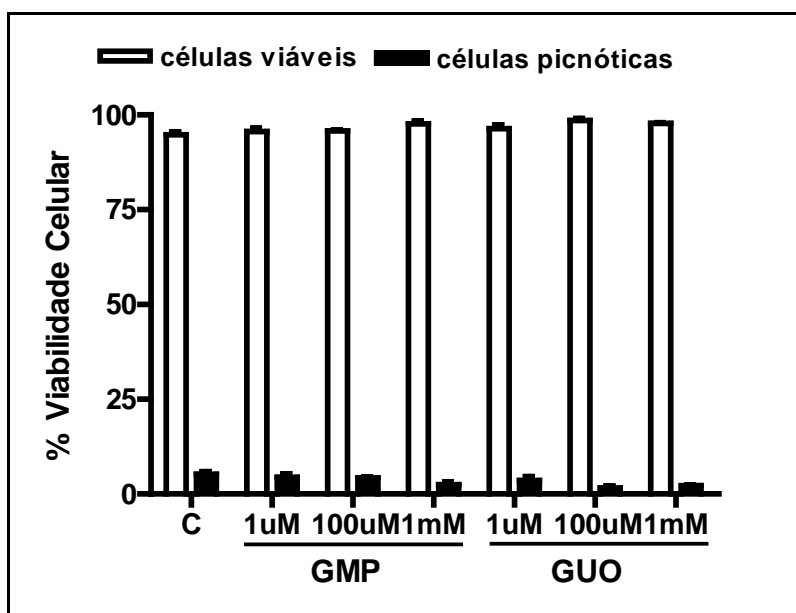


Figura 15: **Efeito de GMP e GUO na indução de apoptose em neurônios cerebelares cultivados em meio condicionado de astrócitos.** Neurônios cerebelares obtidos de ratos P7 foram cultivados por 24h em meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO (1 μ M, 100 μ M ou 1 mM). Após o tratamento, as células foram coradas com HOESCHT 33342 (5 μ g/mL) e os núcleos picnóticos foram contados. Os valores representam a média \pm erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

4.3.4. O efeito do meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO sobre a adesão celular

Os neurônios cerebelares foram cultivados por 12 ou 24 horas com o meio condicionado de astrócitos tratados com 100 μ M de GMP ou GUO. Após este período as células foram incubadas por 5, 15 ou 30 minutos em PBS suplementado com 2 mM de EDTA. Após este período de incubação o sobrenadante foi coletado e as células soltas foram contadas em câmara de Neubauer.

Na Figura 16 A, observou-se que após 12 horas de cultivo há uma diminuição significativa do número de células desprendidas em todos os tempos de incubação com PBS/EDTA. Na Figura 16 B, observou-se que após 24 h de cultivo há diminuição significativa do número de células desprendidas somente nos grupos GMP e GUO/5 min com PBS/EDTA e no grupo GUO/15 min com PBS/EDTA, quando comparado ao controle.

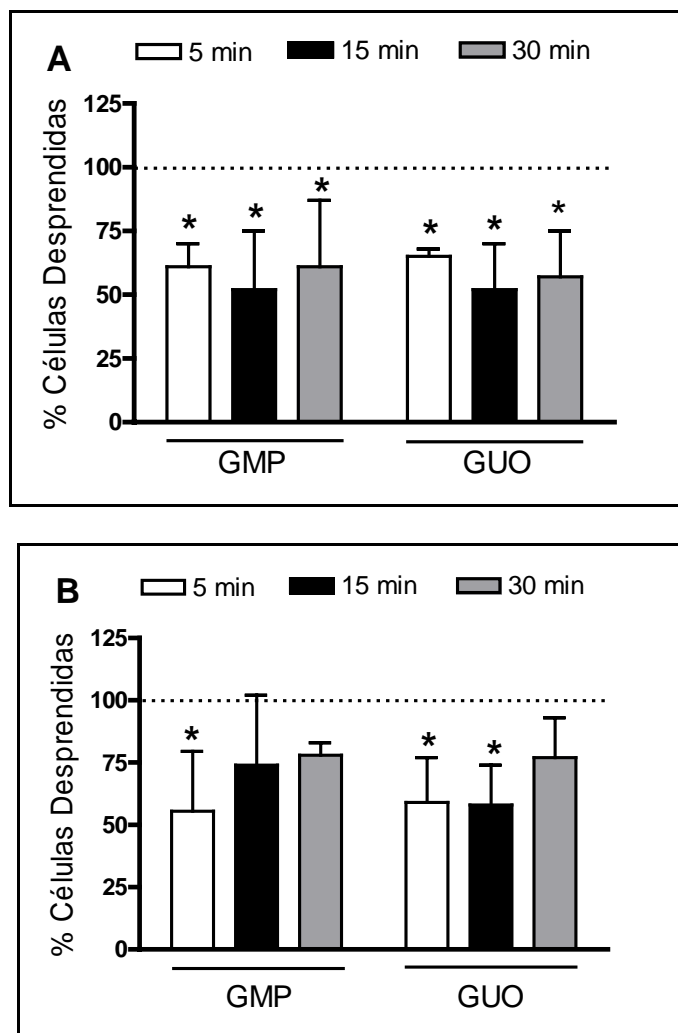


Figura 16: Meio Condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO aumenta a adesão celular em neurônios granulares do cerebelo. Neurônios cerebelares obtidos de ratos P7 foram cultivados por 24h em meio condicionado de astrócitos tratados com 100 μ M de GMP ou GUO. Após o tratamento, as células foram incubadas com PBS acrescido de 2mM de EDTA por 5, 15 ou 30 minutos, e o número de células desprendidas foi quantificado após (A) 12 ou (B) 24 horas. Os valores representam a média \pm erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. A diferença significativa foi observada entre todos os tratamentos quando comparado com o controle (A); grupos GMP e GUO/5 min e grupo GUO/15 min quando comparado ao controle (B) (* $p < 0,05$).

4.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM GMP OU GUO EM NEURÔNIOS CULTIVADOS EM MEIO NEUROBASAL

4.4.1. O efeito do tratamento com GMP ou GUO sobre o número de neurônios em cultura

Para verificar se o tratamento com GMP ou GUO modifica o número de neurônios em cultura, como foi observado em co-cultura de neurônios sobre astrócitos (FRANCISCO, 2004) e em neurônios cultivados em meio condicionado de astrócitos tratados com os DG (Figura 12), neurônios granulares foram cultivados em meio Neurobasal na presença de 1 μ M, 100 μ M ou 1 mM de GMP ou GUO. Após 24h, as células foram fixadas e foi realizada imunocitoquímica para a proteína β -tubulina III, para posterior contagem do número total dos neurônios.

Na Figura 17, observa-se um aumento do número de neurônios encontrados nos grupos tratados quando comparado ao grupo controle. Este aumento no número de neurônios corresponde a 97 %, 131 % e 112 % quando os neurônios são cultivados em meio Neurobasal tratados com 1 μ M, 100 μ M ou 1 mM de GMP, respectivamente, e a 179 %, 157 % e 143 % quando os neurônios são cultivados em meio Neurobasal tratados com 1 μ M, 100 μ M ou 1 mM de GUO, respectivamente.

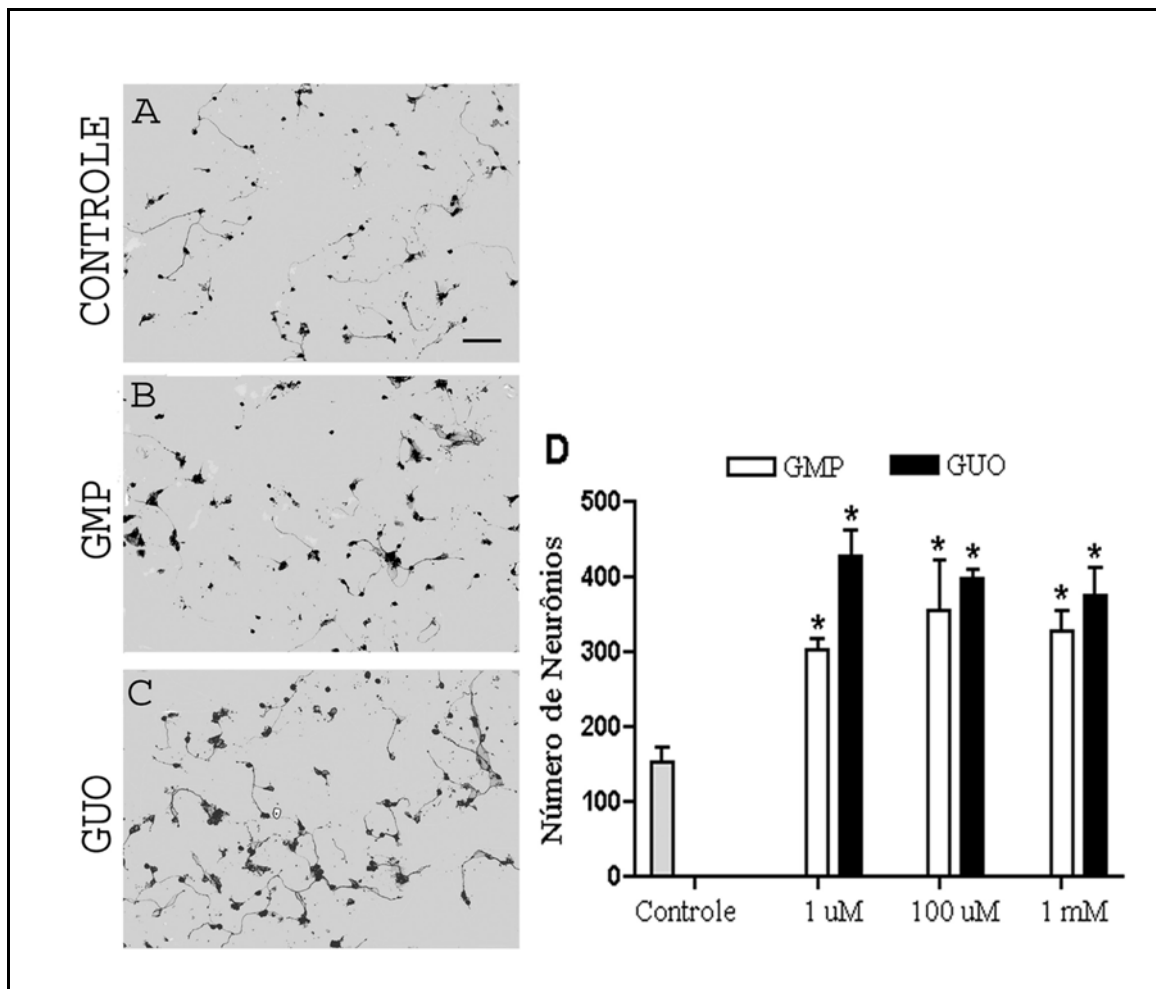


Figura 17: **Tratamento com GMP ou GUO aumenta o número de neurônios cerebelares em cultura purificada.** Neurônios granulares do cerebello foram obtidos de ratos P7 e cultivados por 24h em meio Neurobasal (A) na presença de (B) GMP ou (C) GUO (1 μ M, 100 μ M, B e C ou 1 mM). O número total de neurônios (D) foi obtido pela contagem do número de corpos celulares positivos para a proteína β -tubulina III, de três experimentos independentes realizados em triplicata. Diferença significativa foi observada em todos os tratamentos em relação ao controle (* $p < 0,05$). Barra = 20 μ m.

4.4.2. O efeito do tratamento de neurônios com GMP ou GUO sobre o crescimento neurítico

Para investigar se o tratamento com GMP ou GUO sobre os neurônios granulares em cultura modula o crescimento neurítico, o comprimento dos neuritos e o número de neuritos por neurônios, as células foram imunomarcadas para β -tubulina III 24 horas após o tratamento com os DG. A Tabela 2 mostra que o tratamento dos neurônios com 1 μ M, 100 μ M ou 1 mM de GMP ou GUO não induz alteração no número de neuritos por neurônio, nem na distribuição dos neuritos por comprimento ou no comprimento total dos neuritos.

Tabela 2. O cultivo de neurônios granulares do cerebelo em meio Neurobasal na presença de GMP ou GUO não altera a neuritogênese.

Distribuição dos neuritos por comprimento (μm)	Controle	GMP			GUO		
		1 μM	100 μM	1 mM	1 μM	100 μM	1 mM
% neurônios							
0 - 50	49,4 ± 14,0	70,9 ± 7,0	69,7 ± 13,0	80,3 ± 6,0	73,5 ± 10,0	71,0 ± 5,0	72,7 ± 10,0
50 - 100	39,61 ± 10,0	25,2 ± 6,0	19,6 ± 5,0	16,0 ± 4,0	21,6 ± 8,0	23,6 ± 3,0	22,1 ± 7,0
100 - 200	8,6 ± 3,0	4,0 ± 5,0	10,2 ± 7,0	3,7 ± 2,0	4,3 ± 2,0	4,3 ± 2,0	4,8 ± 3,0
> 200	2,1 ± 1,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Comprimento Total de Neuritos (μm)	—	—	—	—	—	—	—
	34,5 ± 11,6	29,4 ± 5,1	24,5 ± 2,4	27,5 ± 8,1	22,4 ± 5,6	23,7 ± 6,7	24,4 ± 7,4
Neuritos/ Neurônio	Controle	GMP			GUO		
		1 μM	100 μM	1 mM	1 μM	100 μM	1 mM
% neurônios							
0	33,5 ± 6,0	28,0 ± 2,0	27,8 ± 2,0	25,7 ± 1,0	38,5± 0,3	39,8 ± 12,0	31,0 ± 2,0
1	57,8 ± 4,0	73,0 ± 8,0	67,4 ± 4,0	74,4 ± 9,0	59,7± 6,0	63,2 ±11,0	71,0 ± 5,0
2	12,6 ± 8,0	4,6 ± 2,0	8,2 ± 4,0	7,4 ± 3,0	7,7 ± 3,0	4,6 ± 1,0	4,7 ± 2,0
3 ou +	1,2 ± 6,0	3,8 ± 2,0	5,9 ± 4,0	1,0 ± 1,0	7,2 ± 5,0	5,6 ± 3,0	3,8 ± 4,0

Os neurônios cerebelares obtidos de ratos P7 foram cultivados por 24h em meio Neurobasal na presença de GMP ou GUO. Após 24h de cultura, o comprimento dos neuritos e o número de neuritos por neurônio foram avaliados utilizando o Software Sigma Scan Pro (Jandel Scientific). Para todas as análises verificou-se no mínimo 100 neurônios de três experimentos independentes realizados em triplicata, e em nenhum grupo foi verificada diferença significativa quando comparado ao controle.

4.4.3. O efeito do tratamento com GMP ou GUO sobre a viabilidade celular neuronal

Para investigar se o aumento observado no número de neurônios após o cultivo de neurônios em meio neurobasal na presença de GMP ou GUO foi promovido pelo aumento da sobrevivência neuronal, a viabilidade celular foi determinada pela técnica de redução do MTT e pela marcação de núcleos picnóticos.

Como mostra na Figura 18, o tratamento com GMP ou GUO (1 μ M, 100 μ M ou 1 mM) não alterou o número de neurônios viáveis, o que demonstra que o aumento no número de neurônios não é decorrente ao aumento da sobrevivência neuronal.

Imagens de microscopia de fluorescência de neurônios corados com HOESCHT 33342, após 24h de cultivo em meio Neurobasal na presença de GMP ou GUO podem ser observadas na Figura 19. A análise quantitativa pode ser observada na Figura 20, onde um pequeno número de células apoptóticas é encontrado em todos os tratamentos.

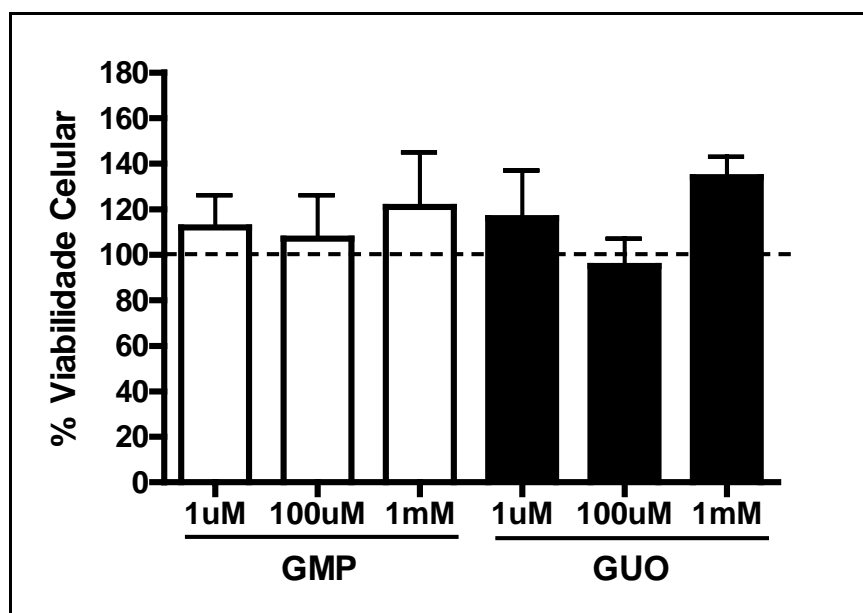


Figura 18: **Avaliação da viabilidade celular em neurônios granulares do cerebelo cultivados em meio Neurobasal na presença de GMP ou GUO.** Neurônios cerebelares obtidos de ratos P7 foram cultivados por 24h em meio Neurobasal tratados com GMP ou GUO (1 μ M, 100 μ M ou 1 mM). A viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do MTT. Os valores representam a média \pm erro padrão de quatro experimentos independentes realizados em triplicata.

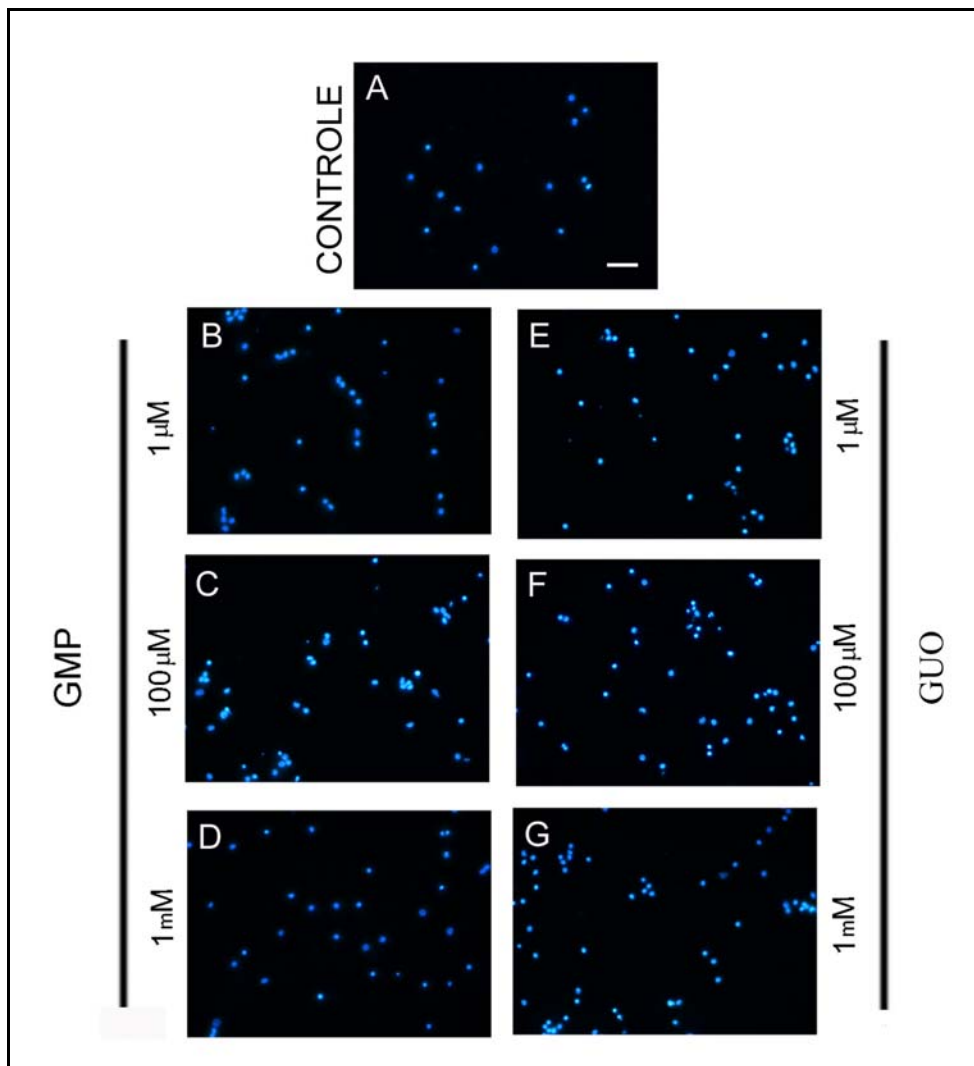


Figura 19: Imagens de microscopia de fluorescência de neurônios corados com HOESCHT 33342, após 24h de cultivo em meio Neurobasal na presença de GMP ou GUO. Neurônios cerebelares foram obtidos de ratos P7 e cultivados por 24h (A) em meio neurobasal na presença de GMP ou GUO (1 μ M, 100 μ M e 1 mM) (B-G). Após o tratamento, as células foram coradas com HOESCHT 33342 (5 μ g/mL) e os núcleos picnóticos foram contados. Barra = 20 μ m.

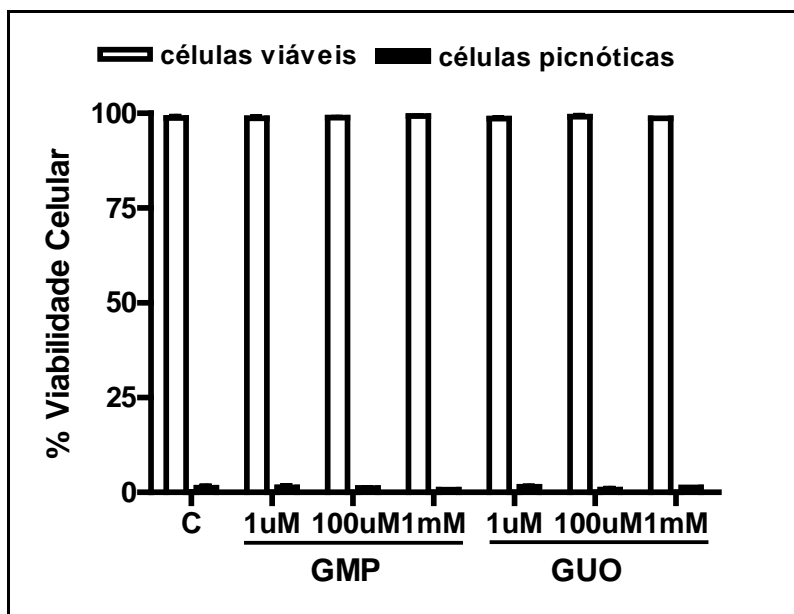


Figura 20: **Efeito de GMP e GUO na indução de apoptose em neurônios cerebelares cultivados em meio neurobasal.** Neurônios cerebelares foram obtidos de ratos P7 e cultivados por 24h em meio Neurobasal na presença de GMP ou GUO (1 μ M, 100 μ M ou 1 mM). Após o tratamento, as células foram coradas com HOESCHT 33342 (5 μ g/mL) e os núcleos picnóticos foram contados. Os valores representam a média \pm erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

4.4.4. Mecanismo de ação do efeito GMP ou GUO sobre o número de neurônios em cultura

4.4.4.1. Participação dos receptores de adenosina (ADO) no aumento de número de neurônios em cultura induzido por GMP e GUO

Para determinar se a ação de GMP e GUO no aumento do número de neurônios, está envolvida com a ativação dos receptores de ADO, os neurônios granulares do cerebelo foram tratados com GMP ou GUO (100 μ M) na presença de inibidores de receptores de ADO. Após 24 h de cultivo, os neurônios foram fixados e as células foram coradas com HOESCHT 33342 (5 μ g/mL) para posterior avaliação do numero total de células através da contagem dos núcleos celulares.

Imagens de microscopia de fluorescência de neurônios corados com HOESCHT 33342, após 24h de cultivo em meio Neurobasal na presença de GMP ou GUO e antagonistas de receptores ou inibidor do transporte de adenosina podem ser observadas na Figura 21 e 22, respectivamente. Como mostra na Figura 23, tanto GMP como GUO aumenta de forma significativa o número de neurônios em cultura, quando comparado ao controle. A adição de ZM 241385, um antagonista específico do receptor A_{2A} de adenosina, preveniu totalmente este fenômeno. Porém quando foi acrescentado o DPCPX (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine), um antagonista específico do receptor A_1 de adenosina ou quando se adicionou o ligante 8-PT (8-fenil-teofilina), um antagonista inespecífico dos receptores de adenosina, foi observado número de neurônios semelhantes ao tratamento com GMP ou GUO. Além disso, quando foi utilizado o dipiridamol (DIP) (inibidor do transporte de nucleosídeos) foi encontrado um grande número de neurônios, de forma

similar ao número encontrado no tratamento somente com GMP ou GUO, o que indica que o efeito dos DG é extracelular. Os inibidores utilizados não tiveram efeito *per se*.

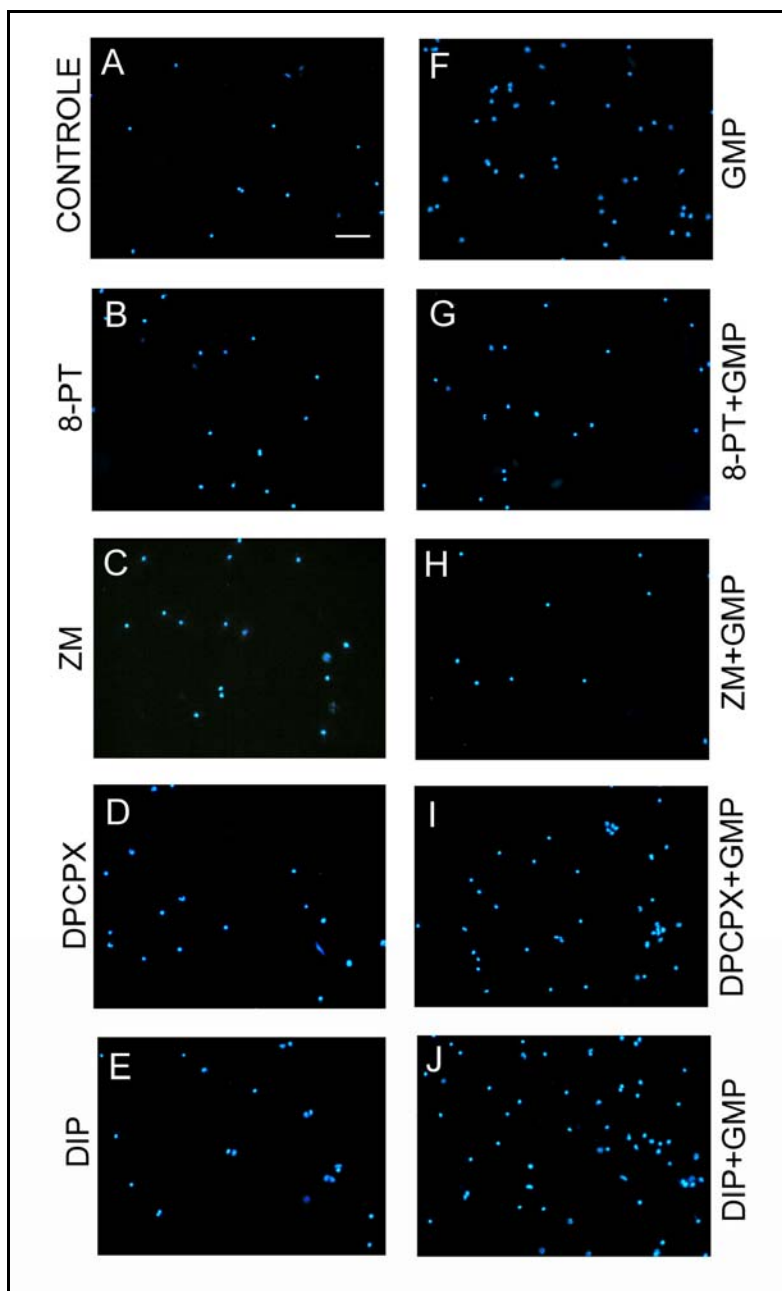


Figura 21: Imagens de microscopia de fluorescência de neurônios cerebelares corados com HOESCHT 33342, após 24h de cultivo em meio Neurobasal na presença de GMP e ligantes do sistema adenosinérgico. Os neurônios cerebelares foram obtidos de ratos P7, cultivados por 24h em meio Neurobasal e tratados com GMP (100 μ M) na presença de antagonistas de receptores de adenosina ou do inibidor de transporte. Após o tratamento, as células foram coradas com HOESCHT 33342 (5 μ g/mL) e o número total de núcleos foi contado. (A) Controle; (B) 8-PT (20 η M); (C) ZM (50 η M); (D) DPCPX (100 η M); (E) DIP (10 μ M); (F) GMP (100 μ M); (G) 8-PT + GMP; (H) ZM + GMP; (I) DPCPX + GMP; (J) DIP + GMP. As imagens foram analisadas de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. Barra = 20 μ m.

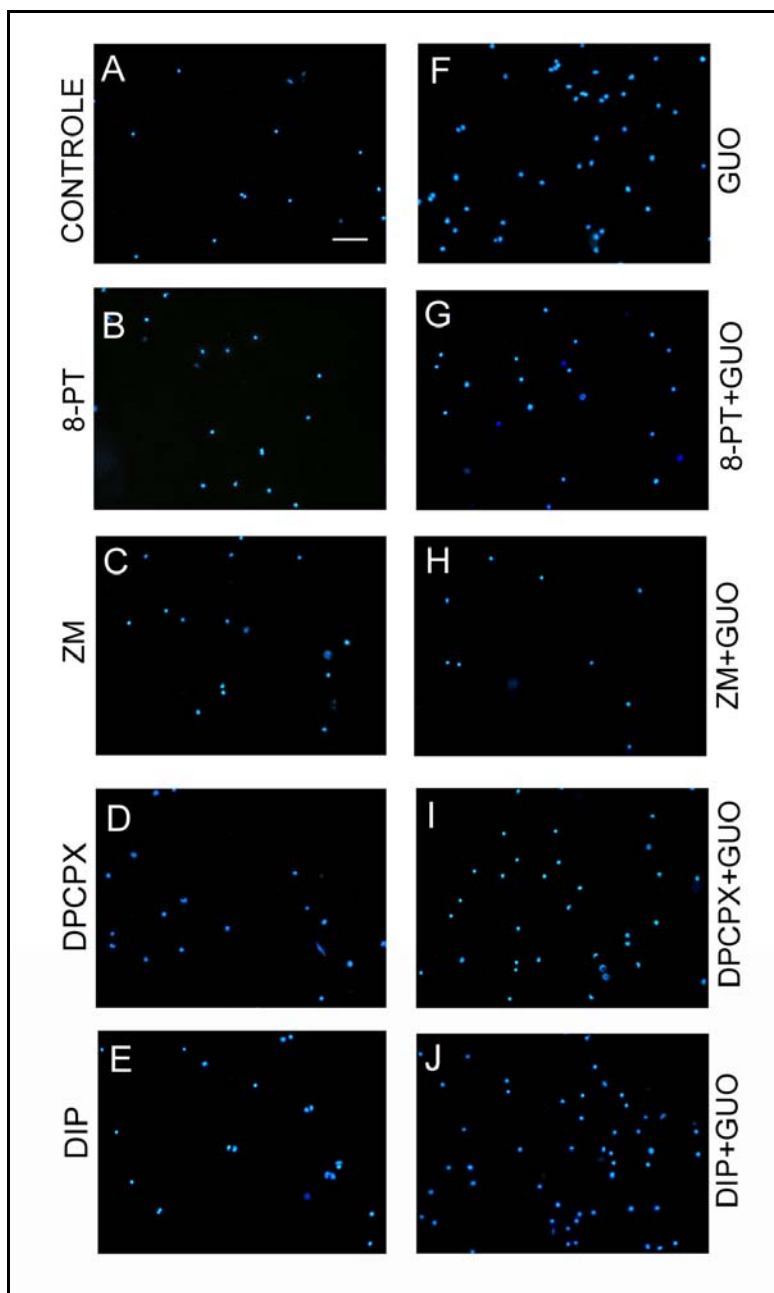


Figura 22: Imagens de microscopia de fluorescência de neurônios corados com HOESCHT 33342, após 24h de cultivo em meio Neurobasal na presença de GUO e ligantes do sistema adenosinérgico. Os neurônios cerebelares foram obtidos de ratos P7, cultivados por 24h em meio Neurobasal e tratados com GUO (100 μ M) na presença de antagonistas de receptores de adenosina ou inibidor do transporte de adenosina. Após o tratamento, as células foram coradas com HOESCHT 33342 (5 μ g/mL) e o número total de núcleos foi contado. (A) Controle; (B) 8-PT (20 η M); (C) ZM (50 η M); (D) DPCPX (100 η M); (E) DIP (10 μ M); (F) GUO (100 μ M); (G) 8-PT + GUO; (H) ZM + GUO; (I) DPCPX + GUO; (J) DIP + GUO. As imagens foram analisadas de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. Barra = 20 μ m.

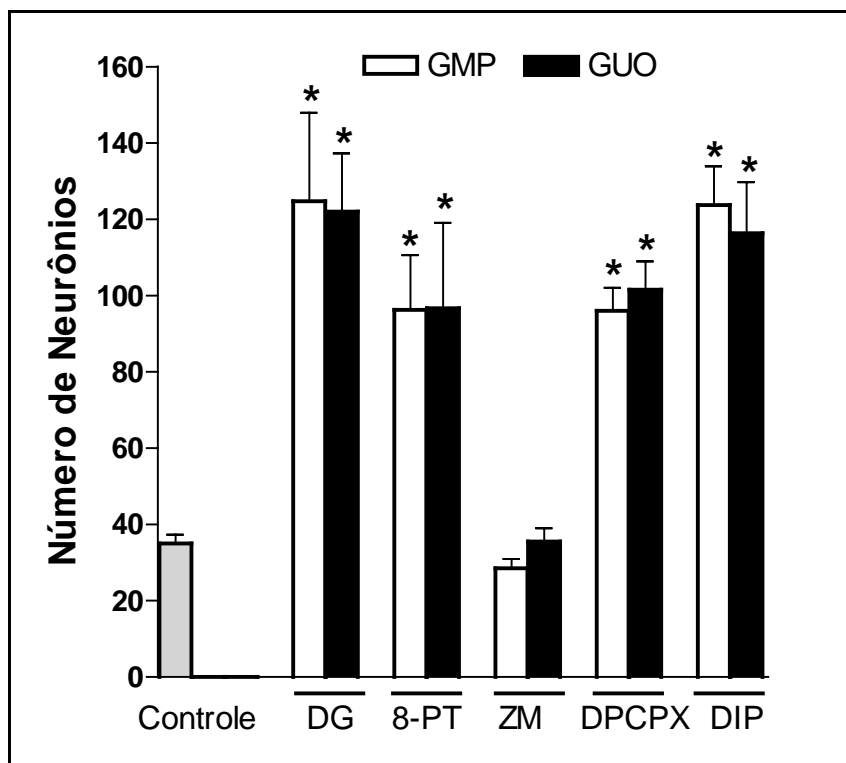


Figura 23: Efeito de ligantes do sistema adenosinérgico no número de neurônios cerebelares tratados com GMP ou GUO. Os neurônios cerebelares obtidos de ratos P7 foram cultivados por 24h em meio Neurobasal e foram tratados com GMP ou GUO (100 μ M) na presença de antagonistas de receptores de adenosina ou em presença de inibidor do transporte. Após o tratamento, as células foram coradas com HOESCHT 33342 (5 μ g/mL) e o número total de neurônios foi obtido pela contagem dos núcleos. DG (Derivados da guanina); 8-Fenil-teofilina (8-PT, 20 η M); ZM 241385 (ZM, 50 η M); DPCPX (DPCPX, 100 η M); Dipiridamol (DIP, 10 μ M). As imagens foram analisadas de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. Diferença significativa foi observada nos grupos GMP e GUO comparado ao controle (* $p < 0,05$).

4.4.4.2. Participação dos receptores glutamatérgicos no aumento de número de neurônios em cultura induzido por GMP ou GUO

Para determinar se GMP ou GUO está agindo também via receptores glutamatérgicos, os neurônios granulares do cerebelo foram tratados com GMP ou GUO (100 μ M) na presença de antagonistas específicos de receptores de glutamato (GLU). Após 24 h de cultivo, os neurônios foram fixados e as células foram coradas com HOESCHT 33342 (5 μ g/mL), para posterior avaliação do número total de células através da contagem dos núcleos.

Imagens de microscopia de fluorescência de neurônios corados com HOESCHT 33342, após 24h de cultivo em meio Neurobasal na presença de GMP ou GUO e antagonistas de receptores de glutamato podem ser observadas na Figura 24.

Na Figura 25, a adição de (+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo(a,b)ciclohepteno-5,10-imina (MK-801) (um antagonista não-competitivo do receptor NMDA) ou de γ -D-glutamilamino-metilulfonato (GAMS) (antagonista do receptor cainato) preveniu este fenômeno, o que nos mostra que a via glutamatérgica também participa do efeito induzido pelas purinas. Os inibidores utilizados não tiveram efeito *per se*.

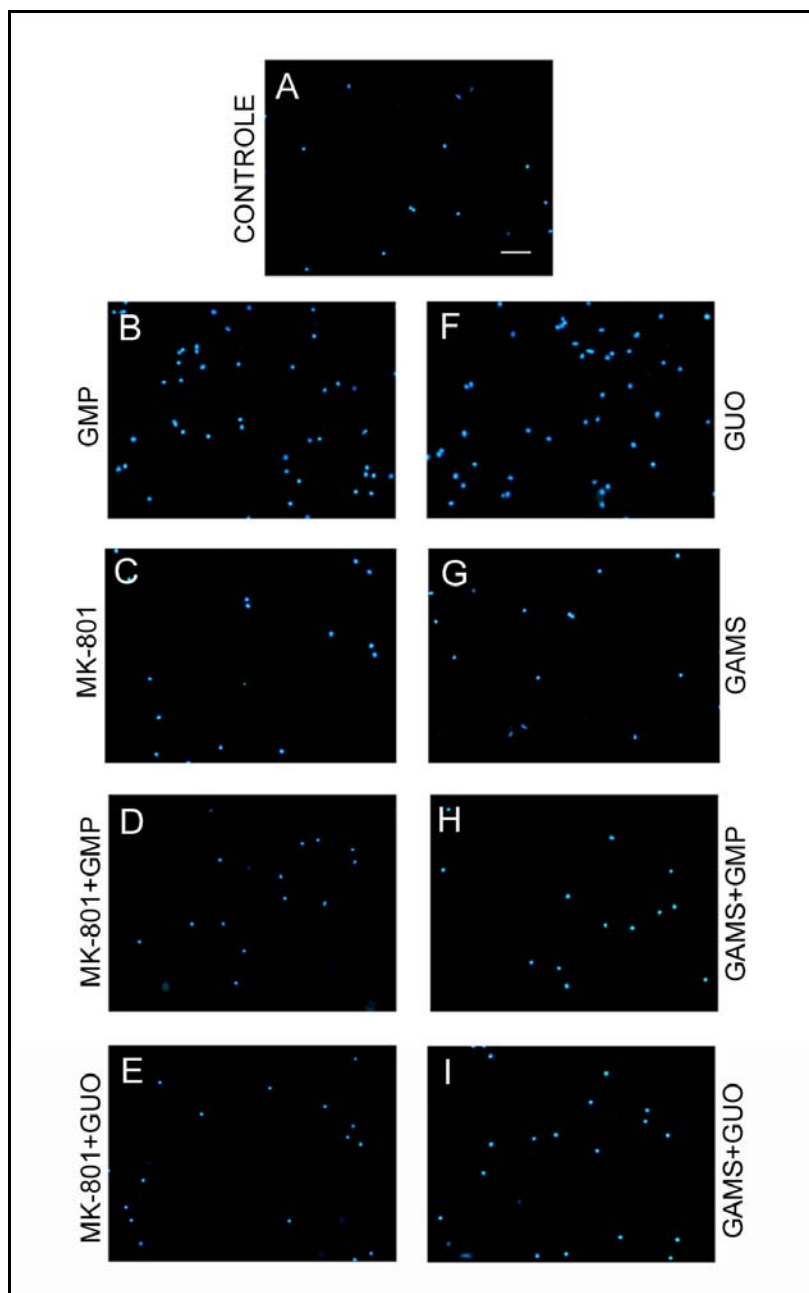


Figura 24: Imagens de microscopia de fluorescência de neurônios corados com HOESCHT 33342, após 24h de cultivo em meio Neurobasal na presença de GMP ou GUO e antagonistas glutamatérgicos. Os neurônios cerebelares foram obtidos de ratos P7, cultivados por 24h em meio Neurobasal e tratados com GMP ou GUO (100 μ M) na presença de antagonistas de receptores de glutamato. Após o tratamento, as células foram coradas com HOESCHT 33342 (5 μ g/mL) e o número total de núcleos foi contado. (A) Controle; (B) GMP (100 μ M); (C) MK-801 (1 μ M); (D) MK-801 + GMP; (E) MK-801 + GUO; (F) GUO (100 μ M); (G) GAMS (100 μ M); (H) GAMS + GMP; (I) GAMS + GUO. As imagens foram analisadas de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. Barra = 20 μ m.

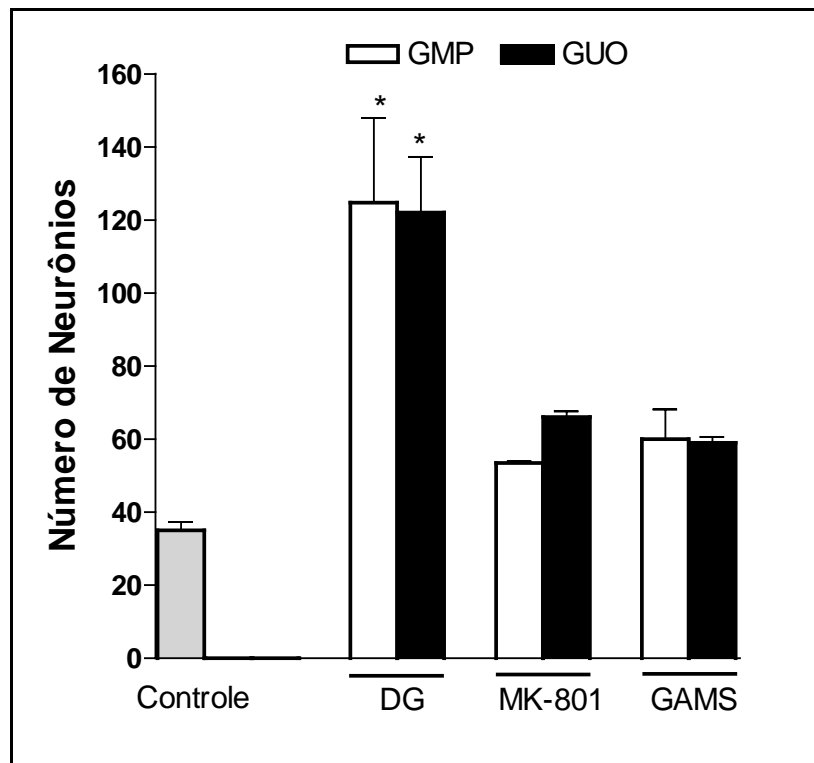


Figura 25: **Efeito de antagonistas de receptores glutamatérgicos no número de neurônios cerebelares tratados com GMP ou GUO.** Os neurônios cerebelares foram obtidos de ratos P7, cultivados por 24h em meio Neurobasal e tratados com GMP ou GUO (100 μ M) na presença de antagonistas de receptores de glutamato. Após o tratamento, as células foram coradas com HOESCHT 33342 (5 μ g/mL) e o número total de neurônios foi obtido pela contagem dos núcleos. MK-801 (1 μ M); GAMS (100 μ M). As imagens foram analisadas de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. Diferença significativa foi observada nos grupos GMP e GUO quando comparado ao controle (* $p < 0,05$).

4.4.4.3. Avaliação das vias de sinalização

Para determinar as moléculas de sinalização celular envolvidas no aumento de neurônios em cultura após o tratamento direto com GMP ou GUO, os neurônios granulares do cerebelo foram tratados com GMP ou GUO (100 μ M) na presença de inibidores específicos de proteínas quinases intracelulares. Após 24 h de cultivo, os neurônios foram fixados e as células foram coradas com HOESCHT 33342 (5 μ g/mL) para posterior avaliação do número total de células através da contagem dos núcleos.

Imagens de microscopia de fluorescência de neurônios corados com HOESCHT 33342, após 24h de cultivo em meio Neurobasal na presença de GMP ou GUO e inibidores de proteínas quinases podem ser observadas na Figura 26 e 27, respectivamente.

Como mostra na Figura 28, o GMP ou GUO aumentou significativamente o número de neurônios em cultura, quando comparado ao controle. A adição de PD 98059 50 μ M (inibidor específico da proteína MEK), KN-62 10 μ M (inibidor específico da proteína CaMKII), queleritrina 10 μ M (inibidor específico da proteína PKC), wortmanina 1 μ M (inibidor específico da proteína PI3-K) e H-89 5 μ M (um inibidor específico da proteína quinase dependente de AMPc, PKA), preveniu este aumento do número de neurônios. Os inibidores utilizados não tiveram efeito *per se*.

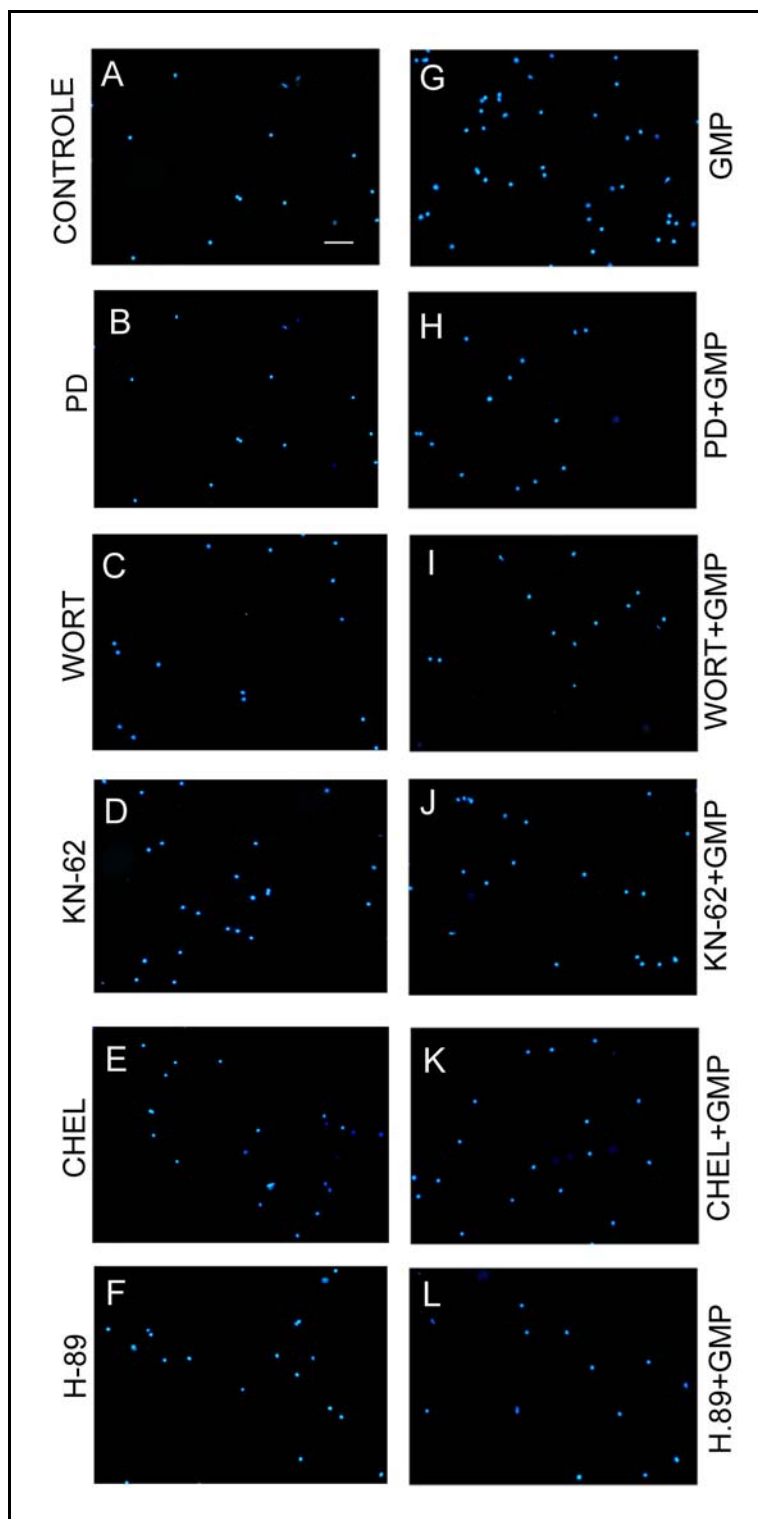


Figura 26: Imagens de microscopia de fluorescência de neurônios cerebelares corados com HOESCHT 33342, após 24h de cultivo em meio Neurobasal na presença de GMP e inibidores de proteínas quinases. Os neurônios cerebelares foram obtidos de ratos P7, cultivados por 24h em meio Neurobasal e tratados com GMP (100 μ M) na presença de inibidores específicos de proteínas quinases. Após o tratamento, as células foram coradas com HOESCHT 33342 (5 μ g/mL) e o número total de núcleos foi contado. (A) Controle; (B) PD 98059 (PD, 50 μ M); (C) wortmanina (WORT, 1 μ M); (D) KN-62 (KN-62, 10 μ M); (E) queleretrina (CHEL, 10 μ M); (F) H-89 (H-89, 5 μ M); (G) GMP (100 μ M); (H) PD + GMP; (I) WORT + GMP; (H) KN-62 + GMP; (I) CHEL + GMP; (J) H-89 + GMP. As imagens foram analisadas de 3 experimentos independentes em triplicata. Barra = 20 μ m.

Figura 27: Imagens de microscopia de fluorescência de neurônios corados com HOESCHT 33342, após 24h de cultivo em meio neurobasal na presença de GUO e inibidores de proteínas quinases. Neurônios cerebelares foram obtidos de ratos P7, cultivados por 24h em meio neurobasal e tratados com GUO (100 μ M) na presença de inibidores específicos de proteínas quinases. Após o tratamento, as células foram coradas com HOESCHT 33342 (5 μ g/mL) e o número total de núcleos foi contado. (A) Controle; (B) PD 98059 (PD, 50 μ M); (C) wortmanina (WORT, 1 μ M); (D) KN-62 (KN-62, 10 μ M); (E) queletrina (CHEL, 10 μ M); (F) H-89 (H-89, 5 μ M); (G) GUO (100 μ M); (H) PD + GUO; (I) WORT + GUO; (J) KN-62 + GUO; (K) CHEL + GUO; (L) H-89 + GUO. As imagens foram analisadas de 3 experimentos independentes em triplicata. Barra = 20 μ m.

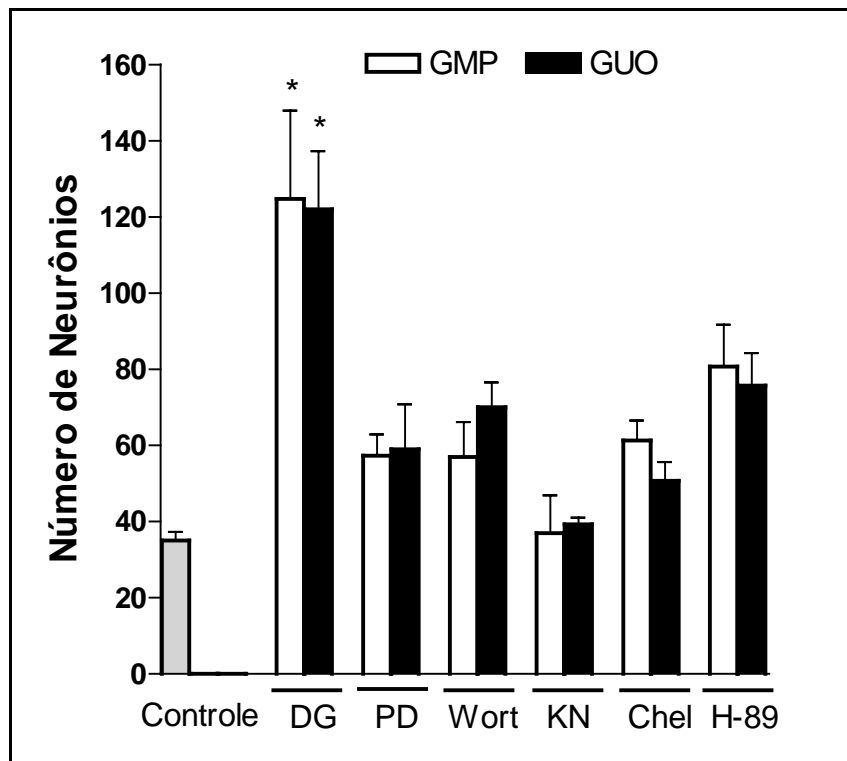


Figura 28: **Efeito de inibidores de proteínas quinases no número de neurônios cerebelares tratados com GMP ou GUO.** Os neurônios cerebelares foram obtidos de ratos P7, cultivados por 24h em meio Neurobasal e tratados com GMP ou GUO (100 μ M) na presença de inibidores específicos de proteínas quinases. Após o tratamento, as células foram coradas com HOESCHT 33342 (5 μ g/mL) e o número total de neurônios foi obtido pela contagem dos núcleos. DG (Derivados da guanina); PD 98059 (PD, 50 μ M); wortmanina (Wort, 1 μ M); KN-62 (KN, 10 μ M); queleretrina (Chel, 10 μ M); H-89 (H-89, 5 μ M). As imagens foram analisadas de 3 experimentos independentes em triplicata. Diferença significativa foi observada nos grupos GMP e GUO quando comparado ao controle (* $p < 0,05$).

4.5. COMPARAÇÃO DO EFEITO DE GMP OU GUO SOBRE O NÚMERO DE NEURÔNIOS CEREBELARES CULTIVADOS EM TRÊS DIFERENTES PROTOCOLOS DE CULTURA

Os neurônios granulares do cerebello foram cultivados em três diferentes protocolos de cultura: sobre uma camada astrócitária pré-tratada com GMP ou GUO, em meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO, ou em meio Neurobasal na presença de GMP ou GUO. Nos diferentes casos observou-se expressivo aumento no número de neurônios induzido pelos DG quando comparados aos respectivos controles (Figura 29). Os neurônios cultivados no meio Neurobasal apresentaram valores absolutos superiores aos valores encontrados na co-cultura e nos neurônios cultivados em meio condicionado, o que sugere um efeito somatório da presença de GMP ou GUO durante o cultivo.

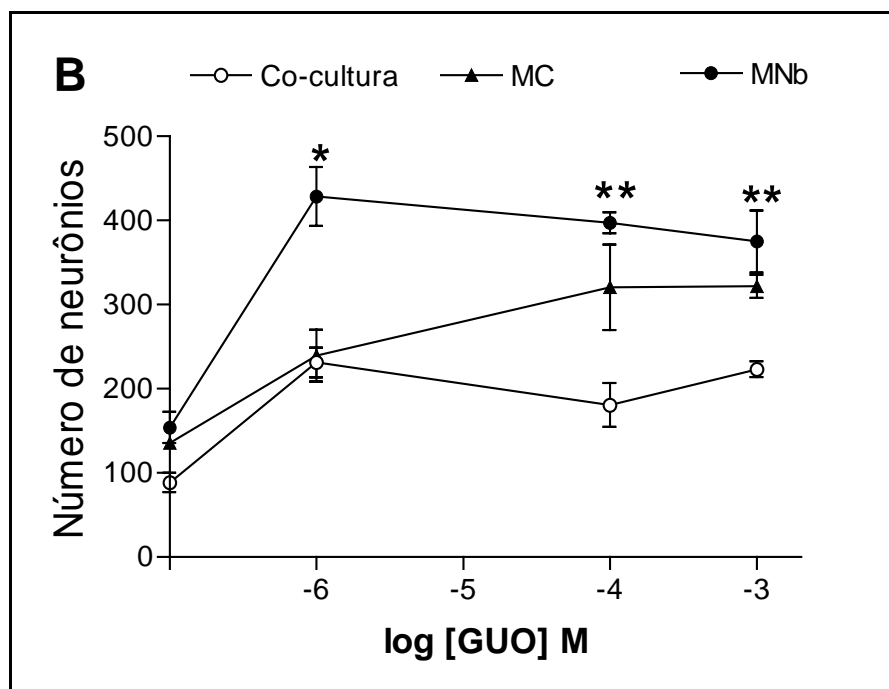
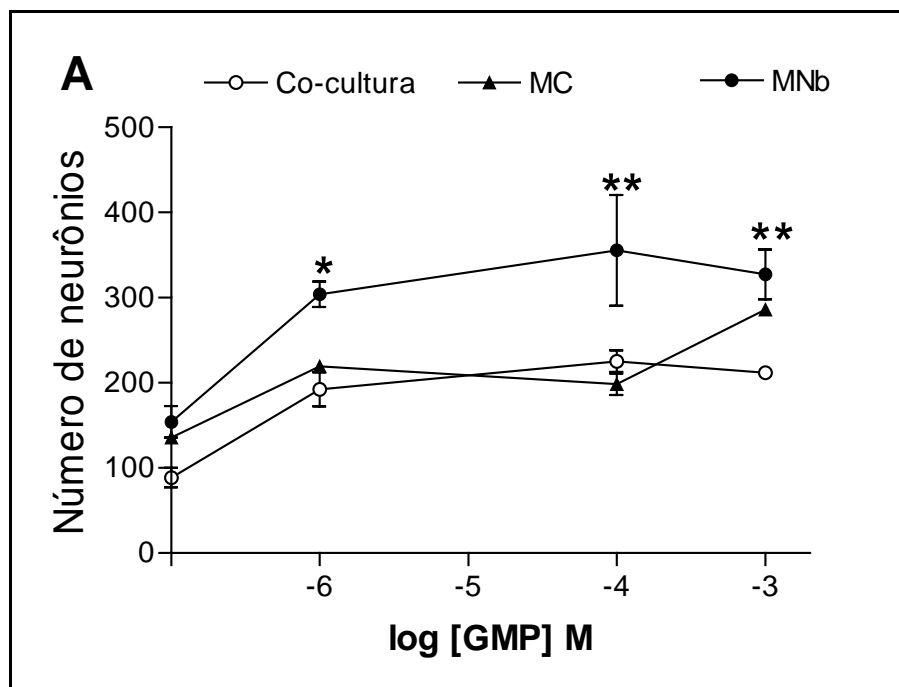


Figura 29: Efeito de GMP (A) ou GUO (B) sobre o número de neurônios granulares do cerebelo. Os neurônios cerebelares foram obtidos de ratos P7, cultivados sobre monocamada astrocitária (co-cultura) tratada com GMP ou GUO (1 μ M, 100 μ M ou 1 mM) por 24 h; cultivados em meio condicionado (MC) de astrócitos tratados com GMP ou GUO (1 μ M, 100 μ M ou 1 mM) ou cultivados em meio Neurobasal (MNb) tratados com GMP ou GUO (1 μ M, 100 μ M ou 1 mM). Após o tratamento, as células foram coradas com HOESCHT 33342 (5 μ g/mL) e o número total de neurônios foi obtido pela contagem dos núcleos. * Indica diferença significativa quando comparada ao controle ($p < 0,05$); ** indica diferença significativa quando comparada ao respectivo tratamento do grupo co-cultura e ao controle ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Os derivados da guanina (DG) são caracterizados em diversos estudos como compostos com ação trófica sobre as células do SNC, como as células gliais, e em células PC12 em cultura, modulando principalmente o crescimento neurítico, proliferação e diferenciação neural (KIM et al., 1991; RATHBONE et al., 1999; CICARRELLI et al., 2000; GYSBERS et al., 2000; CICARRELLI et al., 2001). No entanto, os efeitos dos DG diretamente sobre neurônios, e não em modelos de células neuronais, ainda não foram demonstrados. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos dos DG sobre cultura primária de neurônios cerebelares e determinar a contribuição dos astrócitos e da matriz extracelular (MEC) sobre estes efeitos.

Uma importante contribuição deste estudo foi demonstrar os efeitos dos DG em induzir alterações na organização das proteínas da matriz extracelular (Figura 8 e 30). Alguns trabalhos já observaram a reorganização e aumento da expressão das proteínas LN (LN) e fibronectina (FN) após tratamento com hormônio da tireóide (T3) (MARTINEZ & GOMES, 2002; TRENTIN et al., 2003). Além disso, o pH e os níveis de Ca^{++} também influenciam no arranjo das proteínas da MEC (MIRANTI & BRUGGE, 2002). No entanto, alterações no padrão de organização da LN e FN induzidas por GMP ou GUO não tinham sido descritas anteriormente.

Já foi demonstrado que a união dessas proteínas a seus receptores específicos, as integrinas, desencadeia alteração em proteínas do citoesqueleto e ativação da via de sinalização da ERK (DAVIS, 1993; WIERZBICKA-PATYNOWSKI, 2003). Também foi demonstrado que as vias de sinalização dependentes de PKA e PKC exercem importante

regulação sobre a reorganização da FN (LIN, 2002; YANG et al., 2002). Além disso, foi demonstrado que a ativação da via de sinalização da PI3-K é requerida para modulação das proteínas da MEC induzida por T3 (MARTINEZ, 2002). Em astrócitos tratados com GUO, foi observado que os inibidores específicos das vias de sinalização das proteínas ERK, CaMKII e PKC bloquearam o efeito modulatório da GUO sobre a FN, enquanto o inibidor específico da PI3-K não reverteu este efeito (Figura 11 e 30). Não foram avaliados os receptores envolvidos neste efeito, porém é possível que a ativação de um receptor que mobilize Ca^{++} intracelular, esteja envolvida, considerando que foi verificado a participação de proteínas ativadas pelo aumento de Ca^{++} intracelular, como as proteínas CaMKII e PKC. A ativação da via das MAPKs poderia ser decorrente da união de proteínas da matriz extracelular em seus receptores específicos, as integrinas (Figura 30).

A ativação destas proteínas quinases desencadeia respostas intracelulares em diversas proteínas, como as proteínas do citoesqueleto, desencadeando alterações na adesão celular e expressão de proteínas. Entretanto no presente estudo, não foi observado aumento da expressão das proteínas de matriz. Porém outras proteínas poderiam estar com a expressão aumentada, pois as proteínas quinases desencadeiam a ativação de fatores nucleares, os quais estimulam a transcrição gênica (Figura 9 e 10).

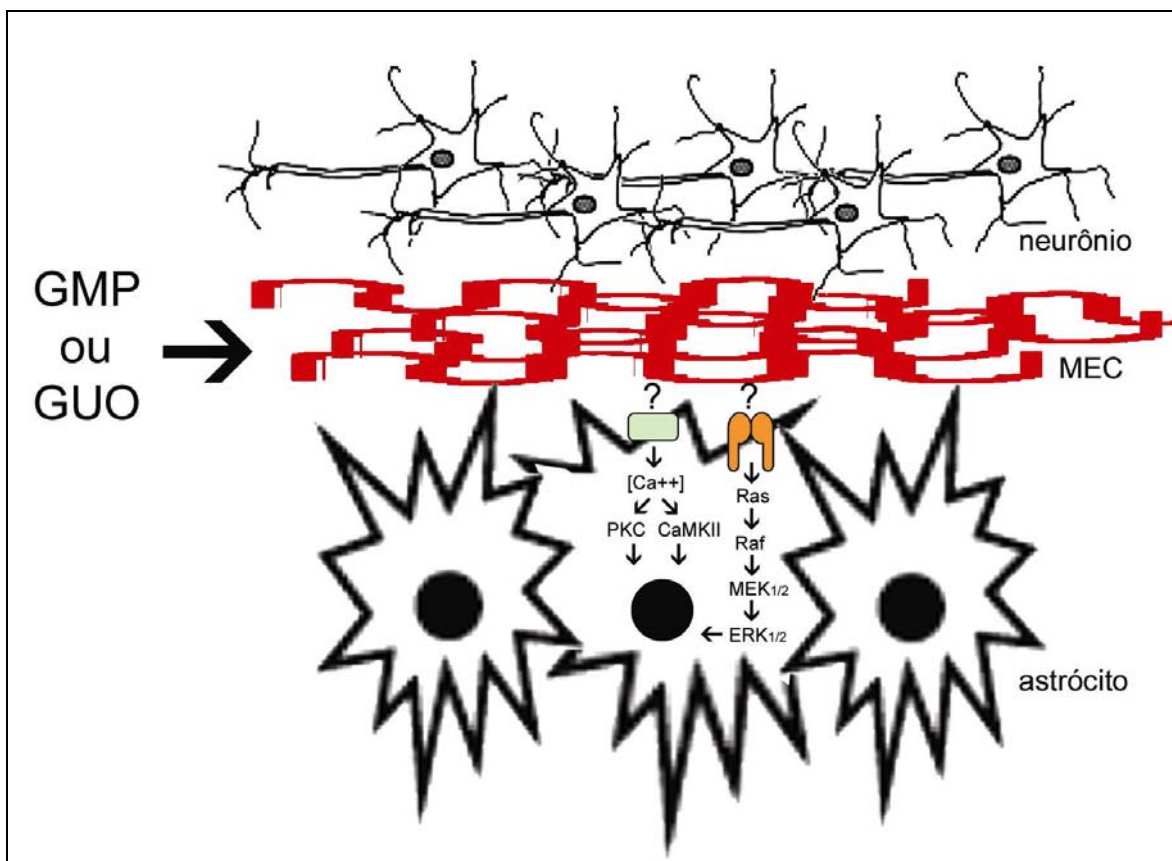


Figura 30: **Representação esquemática da reorganização das proteínas da MEC e possíveis vias de sinalização ativadas por GMP ou GUO.** GMP ou GUO induz alterações na organização da laminina e fibronectina (representadas em vermelho), e ativação de proteínas quinases, como a ERK, PKC e CaMKII. A ativação destas proteínas desencadeia respostas intracelulares em diversas proteínas, como as proteínas do citoesqueleto, desencadeando alterações na adesão celular e expressão de proteínas. Este aumento na adesão celular e/ou modulação de proteínas da MEC pode ser relacionado com o aumento de número de neurônios induzido por GMP ou GUO.

Os efeitos tróficos dos DG podem ocorrer de forma indireta, estimulando as células gliais a produzir neurotrofinas, como NGF e NT-3, e pleiotrofinas, como FGF ou a proteína S100 β em culturas de astrócitos (CICCARELLI et al., 2001). Resultados prévios do nosso laboratório demonstraram que o pré-tratamento dos astrócitos com GMP ou GUO aumenta o número de neurônios em co-cultura (FRANCISCO, 2004; Figura 30). Neste protocolo de cultura não há a presença de DG durante a cultura dos neurônios sobre a camada astrocitária, somente fatores tróficos e proteínas solúveis da matriz extracelular liberados pelos astrócitos durante o pré-tratamento com GMP ou GUO. Além disso, existe o contato célula-célula, onde a camada astrocitária proporciona um ótimo substrato para a manutenção e adesão neuronal (GOMES et al., 2001).

Para discriminar entre o efeito dos DG sobre as interações neurônio-astrócito e o efeito dos fatores liberados pelos astrócitos após tratamento com DG, foram avaliados os efeitos do meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO sobre a cultura de neurônios cerebelares. Após o tratamento de 24 horas com GMP ou GUO, o meio de cultura dos astrócitos foi trocado e mantido por mais 24 horas. Neste trabalho não avaliamos os compostos presentes no meio condicionado, porém já foi demonstrada a liberação de fatores de crescimento e substâncias tróficas no meio condicionado de astrócitos tratados com DGs (CICARRELLI et al, 2001; RATHBONE et al., 1999).

Em relação à presença de DG no meio condicionado, foi demonstrado em astrócitos que GMP é rapidamente hidrolisado à GUO (FRIZZO et al., 2003), e que a concentração de GUO pode permanecer elevada cerca de 30 minutos sob condições de hipóxia ou isquemia (CICCARELLI et al, 1999). Considerando estes dados da literatura sugerimos que no meio condicionado ou são encontradas somente pequenas concentrações de DG, ou eles já tenham sido completamente metabolizados (TASCA et al., 1999a).

Observou-se um expressivo aumento no número de neurônios cultivados em meio condicionado de astrócitos tratados com DG, quando comparados à situação controle (Figura 12). Este resultado apresentou valores absolutos semelhantes aos encontrados na co-cultura, o que demonstra que o aumento no número de neurônios é principalmente devido à ação dos fatores solúveis presentes no meio de cultura após tratamento com GMP ou GUO.

Além disso, foi estabelecida uma comparação entre o efeito do meio condicionado de astrócitos pré-tratados com DGs e o efeito do tratamento direto dos DG sobre neurônios cultivados em meio Neurobasal. Neste protocolo de cultura, os neurônios foram cultivados na presença de GMP ou GUO em um meio de cultura enriquecido com fatores específicos para o crescimento de neurônios (meio Neurobasal). Foi observado um intenso aumento do número de neurônios quando comparado ao controle. Este resultado apresentou valores significativamente maiores aos valores encontrados na co-cultura e nos neurônios cultivados em meio condicionado (Figura 29), o que sugere um efeito somatório de GMP ou GUO às condições de cultura favorecidas pelo meio Neurobasal.

Considerando a observação de um aumento no número de neurônios, investigamos se GMP ou GUO induz alteração na adesão celular, neuritogênese ou na viabilidade neuronal, fatores estes que poderiam contribuir para o aumento de neurônios em cultura.

A adesão celular na MEC ou nas células circundantes é uma função vital para a sobrevivência, migração, proliferação e diferenciação, ajudando a determinar a complexa relação espacial célula-célula que é estabelecida durante o desenvolvimento e que continua sendo cuidadosamente regulada na vida adulta (MILNER, 2001). Para avaliar se GMP ou GUO está modulando o número de células aderidas, os neurônios foram cultivados em meio condicionado de astrócitos pré-tratados com DG. Observou-se que há uma diminuição

significativa do número de células desprendidas (maior adesão) quando os neurônios foram cultivados em meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO (Figura 15). Podemos estabelecer uma relação deste aumento na adesão celular com o efeito dos DG em alterar a organização das proteínas da MEC, pois já foi demonstrado que a organização da FN e da LN podem mediar a adesão celular (KUHN et al., 1995). Este resultado é um indício de que GMP e GUO aumentam a aderência das células ao substrato, possivelmente por reorganizar as proteínas da MEC e/ou estimular alterações do citoesqueleto através da ativação de vias intracelulares.

A neuritogênese é um evento importante para a manutenção e adesão dos neurônios ao substrato, além da comunicação entre eles. A avaliação da neuritogênese foi realizada em neurônios cultivados em meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO, e em neurônios cultivados em meio Neurobasal na presença de GMP ou GUO. Foi verificado que DG não induz alteração no número de neuritos por neurônio, nem na distribuição dos neuritos por comprimento ou no comprimento total dos neuritos (Tabela 2 e 3). Estes resultados são contrários às evidências da literatura em células PC12, as quais demonstram que GUO promove o crescimento neurítico através de mecanismos dependentes e independentes de AMPc (GYSBERS et al., 2000), e que GTP induz efeito neuritogênico através do aumento de Ca^{++} intracelular e ativação da PKC (BERRIDGE, 1993). Entretanto, estes resultados corroboram resultados prévios do nosso laboratório, onde não houve alteração no padrão de neuritogênese em co-culturas de neurônios sobre astrócitos pré-tratados com DG (FRANCISCO, 2004), o que nos leva a concluir que os DG não alteram o padrão de neuritogênese em culturas primárias de neurônios granulares do cerebelo.

A avaliação da sobrevivência dos neurônios cerebelares em culturas demonstrou que o número de neurônios cerebelares viáveis não foi alterado após cultivo em meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO, ou em meio Neurobasal na presença de GMP ou GUO, o que descarta o envolvimento de alterações na sobrevivência neuronal no aumento do número de neurônios (Figura 12 e 17).

Outra avaliação de viabilidade celular realizada foi a contagem de células apoptóticas após tratamento com DG. Diversas evidências na literatura mostram que a ADO promove apoptose em neurônios de embriões de pintos em cultura (WAKADE et al., 1995), células endoteliais (DAWICKI et al., 1997; ROUNDS et al., 1998), timócitos (SZONDY, 1994) e em astrócitos (ABBRACCHIO et al., 1995, 1997; CERUTI et al., 1997; DI IORIO et al., 2002). DI IORIO (2002) propõe dois possíveis mecanismos para esta atividade apoptótica da ADO: um via ativação de receptores A_3 de ADO, e outro através da modulação dos níveis intracelulares de S-adenosil-homocisteína. Além disso, já foi demonstrado que GUO não induz apoptose, embora possa apresentar atividade pro-apoptótica quando estimula a excessiva liberação de ADO, a qual induz apoptose via ativação de seus receptores do subtipo A_3 (DI IORIO et al., 2004).

Um pequeno número de células apoptóticas foi observado em todos os tratamentos (Figura 13, 14, 18 e 19), demonstrando que GMP ou GUO não induz apoptose em neurônios cerebelares e que a integridade das células é mantida tanto na situação controle quanto nos tratamentos com DG. Este resultado confirma que o aumento no número de neurônios induzido por DG não está relacionado com o aumento da sobrevivência neuronal.

Após demonstrarmos que GMP ou GUO aumenta o número de neurônios cerebelares e que este evento está relacionado com a modulação da adesão celular e reorganização das proteínas da MEC, iniciamos o estudo dos possíveis receptores e vias

intracelulares envolvidas neste efeito. Como os receptores dos DG estão sendo caracterizados e não foram clonados, ainda não são bem conhecidos e não estão disponíveis comercialmente, antagonistas específicos para seus receptores. Por esta razão avaliamos o envolvimento dos receptores de adenosina, já que existem estudos mostrando que os DG podem agir de forma pouco específica em receptores purinérgicos (RATHBONE et al., 1999). Além disso, avaliamos o envolvimento dos receptores glutamatérgicos, uma vez que está bem descrito que os DG modulam a transmissão glutamatérgica (SOUZA & RAMÍREZ, 1991; TASCA et al., 1999b; TASCA & SOUZA, 2000; PORCIÚNCULA et al., 2002).

Os nucleotídeos e nucleosídeo da guanina exercem tanto funções intracelulares, como a sinalização transmembrana, quanto funções extracelulares, como moléculas de sinalização intercelular (BOURNE et al., 1990). Para avaliar se GMP ou GUO está agindo no meio intra ou extracelular, os neurônios foram cultivados em meio Neurobasal na presença de GMP ou GUO e de um inibidor do transporte de nucleosídeos. A contagem do número de neurônios no grupo tratado com este inibidor foi semelhante ao grupo tratado somente com GMP ou GUO. Este resultado indica que os DG não precisam ser internalizados para desencadear seus efeitos, demonstrando que o aumento no número de células induzido por GMP ou GUO é extracelular (Figura 23, 24 e 25).

Para avaliação do envolvimento dos receptores de membrana de ADO, os neurônios foram cultivados em meio Neurobasal e tratados com GMP ou GUO na presença de antagonistas dos receptores de ADO. A adição de um antagonista inespecífico dos receptores de adenosina (8-PT) ou de um antagonista específico do receptor A₁ (DPCPX) não alterou o aumento no número de neurônios induzido pelo tratamento com GMP ou GUO. Porém a adição de um antagonista específico do receptor A_{2A} (ZM 241385) preveniu

totalmente o aumento no número de neurônios induzido por GMP ou GUO. Já foi demonstrado que os receptores do subtipo A_2 são acoplados às proteínas- G_s , desencadeando aumento dos níveis de AMPc, com ativação da PKA (VAN CALKER, 1979; CUNHA, 2001). Este aumento de AMPc pode estimular a mobilização de Ca^{++} intracelular, resultando na ativação de proteínas quinases dependentes de Ca^{++} , como a PKC e a CaMKII (Figura 23, 24, 25 e 31).

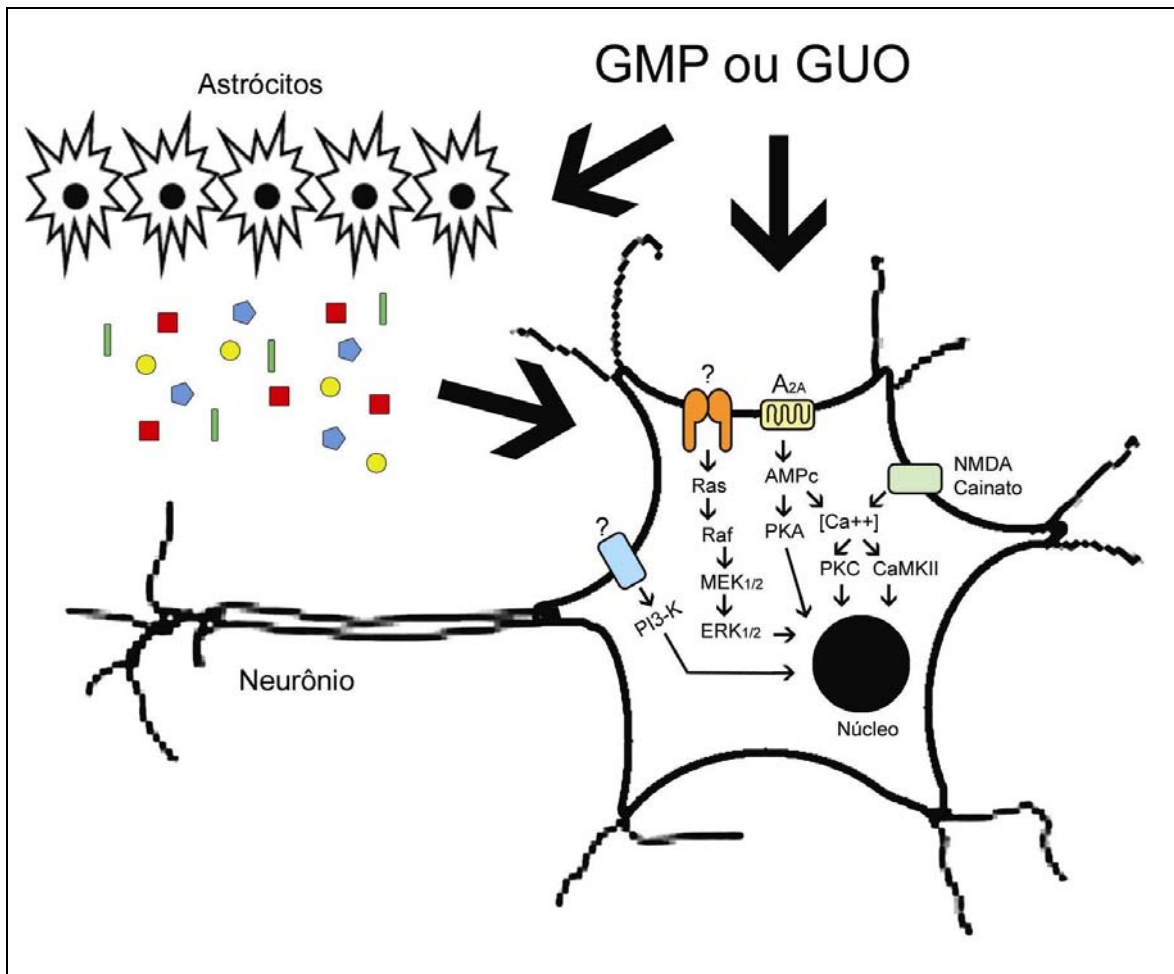


Figura 31: Representação esquemática das vias de sinalização induzidas por GMP ou GUO sobre neurônios cultivados em meio condicionado de astrócitos tratados com DG, e em neurônios cultivados em meio Neurobasal tratados com DG. O efeito de GMP ou GUO em aumentar o número de neurônios é dependente da ativação de receptores A_{2A} de adenosina e NMDA e Cainato de glutamato, e desencadeia a ativação de proteínas quinases, como a ERK, CaMKII, PKC, PKA e PI3-K.

Além da avaliação do envolvimento dos receptores de adenosina, foi avaliado o envolvimento dos receptores de glutamato (GLU) no efeito dos DG em aumentar o número de neurônios. Os neurônios foram cultivados em meio Neurobasal e tratados com GMP ou GUO na presença de inibidores de receptores de GLU. A adição de um antagonista não-competitivo do receptor NMDA (MK-801) ou um antagonista do receptor de cainato (GAMS) preveniu o aumento no número de neurônios induzido por GMP ou GUO (Figura 26, 27 e 31). Este resultado nos mostra que a inibição dos receptores glutamatérgicos reduz o efeito dos DG em aumentar o número de neurônios. Esta informação é de grande importância, pois é a primeira vez que foi demonstrado que o bloqueio de receptores de GLU, reduz os efeitos de DG, diferentemente de diversas evidências da literatura que mostram que os DG inibem a transmissão glutamatérgica através da inibição da união de GLU a seus receptores (SOUZA & RAMÍREZ, 1991; TASCA et al., 1999b; SCHIMDT et al., 2000).

Além disso, é possível estabelecer uma relação entre o envolvimento de receptores de GLU e de ADO, pois vários trabalhos demonstraram que a ativação de receptores glutamatérgicos induz a liberação de ADO e seus nucleotídeos (HOEHN et al., 1990; CRAIG & WHITE, 1991). Já está bem caracterizado que a ativação do receptor NMDA permeia principalmente a entrada de íons Ca^{++} e sódio (Na^+) e a ativação do receptor cainato permeia Na^+ , resultando no aumento de Ca^{++} intracelular. Este aumento de Ca^{++} pode resultar na ativação de proteínas quinases como a PKC e a CaMKII, da mesma maneira que ativação de receptores $\text{A}_{2\text{A}}$ de ADO.

Para finalizar foram utilizados inibidores específicos de proteínas quinases, para determinar as moléculas de sinalização celular envolvidas no aumento de neurônios após o tratamento com DG. A adição de inibidores das proteínas ERK, CaMKII, PKC, PI3-K ou

PKA, preveniu o aumento do número de neurônios induzido por GMP ou GUO (Figura 20, 21, 22 e 31). Estes resultados apontam o envolvimento das vias de sinalização que envolvem a mobilização de Ca^{++} , como as de PKC e CaMKII, sugerindo a ativação de receptores glutamatérgicos e/ou adenosinérgicos. O envolvimento da via da PKA sugere a ativação de receptores de adenosina, ou glutamato. Enquanto que o envolvimento das vias de ERK e PI3-K sugerem a ativação de integrinas e receptores para fatores de crescimento através da sua união a proteínas solúveis da matriz e/ou a fatores tróficos.

Resumindo, os DG induziram um aumento no número de neurônios cerebelares em três diferentes protocolos de cultura. Este efeito possivelmente foi decorrente do aumento da adesão celular e/ou da alteração da organização das proteínas da MEC, mediada pela ativação de diversas vias de sinalização induzida por fatores tróficos liberados e/ou uma ação direta dos DG.

6. CONCLUSÕES

- GMP ou GUO não alterou a expressão de LN e FN, não acompanhando a já demonstrada alteração na organização da MEC.
- As vias de sinalização das proteínas ERK, CaMKII e PKC estão envolvidas na reorganização da FN em astrócitos. No entanto não foi observado envolvimento da via da proteína PI3-K.
- O número de neurônios granulares do cerebelo cultivados em meio condicionado de astrócitos tratados com GMP e GUO, ou cultivados em meio Neurobasal na presença de GMP ou GUO aumentou de forma significativa quando comparado à situação controle.
- Não houve alteração no padrão de neuritogênese após cultivo em meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO, ou após cultivo em meio Neurobasal na presença de GMP ou GUO.
- O número de neurônios viáveis não foi alterado após o cultivo em meio condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO, ou após cultivo em meio Neurobasal na presença de GMP ou GUO.
- O Meio Condicionado de astrócitos tratados com GMP ou GUO promove uma maior adesão de neurônios granulares do cerebelo.
- A inibição do transporte de nucleosídeos não alterou o aumento no número de neurônios cultivados em meio Neurobasal na presença de GMP ou GUO, demonstrando que os DGs exercem um efeito extracelular.

- A inibição dos receptores A_{2A} de adenosina bloqueou o aumento do número de neurônios cultivados em meio Neurobasal na presença de GMP ou GUO, porém não foi observado efeito similar inibindo os receptores A_1 .
- A inibição dos receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA e cainato bloqueou o aumento do número de neurônios cultivados em meio Neurobasal na presença de GMP ou GUO.
- A ativação das vias de sinalização das proteínas ERK, CaMKII, PKC, PI3-K e PKA estão envolvidas na aumento do número de neurônios após cultivo em meio Neurobasal na presença de GMP ou GUO.

7. PERSPECTIVAS

- Determinar as proteínas de adesão envolvidas no efeito de GMP ou GUO em aumentar o número de neurônios granulares do cerebelo;
- Avaliar o envolvimento dos receptores de adenosina e/ou de glutamato na reorganização da FN induzido por GUO;
- Avaliar a interação entre as vias glutamatérgica e adenosinérgica no aumento do número de neurônios induzido por DG.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBRACCHIO, M.P. & BURNSTOCK, G. Purinergic signaling: Pathophysiological roles. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 78:113 -145, 1998.
- ABBRACCHIO, M.P., BRAMBILIA, R., CERUTI, S., KIM, H.O. VON LUBITZ, D.K., JACOBSON, K.A. CATTAMBERRI, F. G Protein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A3 receptors in rat brain. *Molecular Pharmacology*. 48: 1038-1045, 1995.
- ABBRACCHIO, M.P.; CERUTI, S.; BRAMBILLA, R.; FRANCESCHI, C.; MALORNI, W.; JACOBSON, K.A.; VON LUBITZ, D.K.; CATTABENI, F. Modulation of apoptosis by adenosine in the central nervous system: a possible role for the A3 receptor. Pathophysiological significance and therapeutic implications for neurodegenerative disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 825:11-22. 1997.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Molecular biology of the cell. *Garland Science*. 4ed.1463p., 2002.
- BALDO, B.A. Protein blotting: research, applications and its place in protein separation methodology. *Advances in Eletrophoresis*. 407-478, 1994.
- BARRES, B. A. & BARDE, Y. Neuronal and glial cell biology. *Curr. Opin. Neurob.* 10: 642-648, 2000.
- BAU, C.; MIDDLEMISS, P.J.; HINDLEY, S.; JIANG, S.; CICCARELLI, R.; CACIAGLI, F.; DIHIO, P.; WERSTIUK, E.S.; RATHBONE, M.P. Guanosine stimulates neurite outgrowth in PC12 cells via activation of heme oxygenase and cyclic GMP. *Purinergic Signaling*. 1:161-172, 2005.
- BENDER, A.S.; WOODBURY, D.M.; WHITE, H.S. Ionic dependence of adenosine uptake

- into cultured astrocytes. *Brain Research*. 661:1-8, 1994.
- BERRIDGE, M. Inositol triphosphate and calcium signaling. *Nature*. 361: 315-326, 1993.
- BIBEL, M. & BARDE, Y. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous systems. *Genes & Dev*. 14: 2919-2937, 2000.
- BOURNE, H. R.; SANDERS, D. A. & McCORMICK, F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*. 348: 125-131, 1990.
- BUNN, S.J.; SIM, A.T.; HERD, L.M.; AUSTIN, L.M.; DUNKLEY, P.R. Tyrosine hydroxylase phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells: the role of intracellular Ca^{2+} in the histamine H1 receptor-stimulated phosphorylation of Ser8, Ser19, Ser31, and Ser40. *Journal of Neurochemistry*. 64:1370-8, 1995.
- BURGOS, J. S.; BARAT, A.; SOUZA, D. O. & RAMÍREZ, G. Guanine nucleotides protect against kainate toxicity in na ex vivo chick retinal preparation. *FEBS Letters*. 430: 176-180, 1998.
- CERUTI, S.; BARBIERI, D.; VERONESE, E.; CATTABENI, F.; COSSARIZZA, A.; GIAMMARIOLI, A. M.; MOALORNI, W.; FRANCESCHI, C.; ABBRACHIO, M. P. Different pathways of apoptotic revealed by 2-cloro-adenosine and deoxy-D-ribose in mammalian astroglial cells. *Journal of Neuroscience Research*. 47: 372-383, 1997.
- CHEN, Y.; HERTZ, L.; RATHBONE, M.P.; CODE, W. Adenosine and guanosine increase free cytosolic calcium concentration in mouse brain astrocytes through different receptors. *Abstr. Soc. Neurosci.* 19, 687, n. 285.11, 1993.
- CICCARELI, R.; DI IORIO, P.; D'ALMONTE, I.; GUILIANI, P.; FLORIO, T.; CACIAGLI, F.; MIDDLEMISS, P. J. & RATHBONE, M. P. Cultured astrocytes proliferation induced

- by extracellular guanosine involves endogenous adenosine and is raised by the copresence of microglia. *Glia*. 29: 202-211, 2000.
- CICCARELLI, R.; BALLERINI, P.; SBATINO, G.; RATHBONE, M. P.; D'ONOFRIO, M.; CACIAGLI, F. & DI IORIO, P. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 19: 395-414, 2001.
- COLLINS, E. & SIM, A.T.R. Regulation of neuronal PP1 and PP2 during development. *Methods in Molecular Biology*. 21-43, 1998.
- CRAIG, C.G.; WHITE, T.D. Endogenous glycine modulates N-methyl-D-aspartate-evoked release of adenosine and [3H] noradrenaline from rat cortical slices. *European journal of pharmacology*. 197:1-7, 1991.
- CUNHA, R.A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochemistry International*. 38:107-25. Review, 2001.
- DAHL, D.; MAGGINI, L.; GILAD, V.H.. Brain filament proteins in primary cultures derived from chick embryos early in development. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 10(6): 473-80, 1992.
- DAVIS, R.J. The Mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *The Journal of biological chemistry*. 268: 14553-14556, 1993.
- DAWICKI, D.D.; CHATTERJEE, D.; WYCHE, J.; ROUNDS, S. Extracellular ATP and adenosine cause apoptosis of pulmonary artery endothelial cells. *The American journal of physiology*. 273: L485-L494, 1997.
- DEV, K. H.; ROBERTS, P. J. & HENLEY, J. M. Characterisation of the interaction between

- guanylyl nucleotides and AMPA receptors in rat brain. *Neuropharmacology* 35: 1583-1593, 1996.
- DI IORIO, P.; BALLERINI, P.; TRAVERSA, U.; NICOLETTI, F.; D'ALIMONTE, I.; KLEYWEGT, S.; WERSTIUK, E.S.; RATHBONE, M.P.; CACIAGLI, F.; CICCARELLI, R. The antiapoptotic effect of guanosine is mediated by the activation of the PI3-Kinase/AKT/PKB Pathway in cultured rat astrocytes. *Glia*. 46: 356-368, 2004.
- DI IORIO, P.; KLEYWEGT, S.; CICCARELLI, R.; TRAVERSA, U.; ANDREW, C.M.; CROCKER, C.E.; WERSTIUK, E.S.; RATHBONE, M.P. Mechanisms of apoptosis induced by purine nucleosides in astrocytes. *Glia*. 38: 179-190, 2002.
- ENG, L. F. GFAP: the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *Journal of neuroimmunology*. 8: 203-214, 1985.
- EXTON, J. H. Small GTPases minireview series. *The Journal of biological chemistry*. 273: 19923, 1998.
- FARWELL, A. P.; TRANTER, M. P. & LEONARD, J. L. Thyroxine-dependent regulation of integrin-laminin interactions in astrocytes. *Endocrine journal*.. 136: 3909-3915, 1995.
- FRANCISCO, S.R.S. Estudo dos derivados da guanina como agentes protetores e tróficos em astrócitos e neurônios cerebelares. Dissertação de mestrado, UFSC, Florianópolis, 2004.
- FREIRE, E. & COELHO-SAMPAIO, T. Self-assembly of laminin induced by acidic pH. *The Journal of biological chemistry*. 275: 817-822, 2000.
- FRIZZO, M. E. S., SOARES, F. A. A, DALL'ONDER, L.P., LARA, D.R., SWANSON, R.A., SOUZA, D.O. Extracellular conversion of guanine-based purines to guanosine specifically enhances astrocyte glutamate uptake. *Brain Research*. 6:84-89, 2003.

- FRIZZO, M. E. S.; LARA D. R.; DAHM, K. C. S.; PROKOPIUK, A. S.; SWANSON R. & SOUZA, D. O. Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. *Neuroreport*. 12: 1-3, 2001.
- GARCIA-ABREU, J.; CAVALCANTE, L. A. & MOURA NETO, V. Differential patterns of laminin expression in lateral and medial midbrain glia. *Neuroreport*. 6: 761-764, 1995.
- GOMES, F.C.A; SPOHR, T.C.L.S.; MARTINEZ, R.; MOURA NETO, V. Cross-talk between neurons and glia: highlights on soluble factors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 34: 611-620, 2001.
- GU, J.G.; NATH, A.; GEIGER, J.D. Characterization of inhibitor-sensitive and -resistant adenosine transporters in cultured human fetal astrocytes. *Journal of Neurochemistry*. 67: 972-7, 1996.
- GYSBERS, J. W. & RATHBONE, M. P. Guanosine enhances NGF-stimulated neurite outgrowth in PC12 cells. *Neuroreport*. 3: 997-1000, 1992.
- GYSBERS, J. W.; GUARNIERI, S.; MARIGGIÒ, M. A.; PIETRANGELO, T.; FANÒ, G. & RATHBONE, M. P. Extracellular guanosine 5' triphosphate enhances nerve growth factor-induced neurite outgrowth via increases in intracellular calcium. *Neuroscience*. 96: 817-824, 2000.
- HAYDON, P. G. Neurons and glia talk to each other. *Current biology*. 10: 712-714, 2000.
- HOEHN, K.; WHITE, T.D. Glutamate-evoked release of endogenous adenosine from rat cortical synaptosomes is mediated by glutamate uptake and not by receptors. *Journal of Neurochemistry*. 54:1716-1724, 1990.
- HYNES, R. O. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*. 4: 549-554, 1987.

- JACOBSSON, S. O. & FOWLER, C. J. Dopamine and glutamate neurotoxicity in cultured chick telencephali cells: effects of NMDA antagonists, antioxidants and MAO inhibitors. *Neurochemistry international*. 34: 49-62, 1999.
- KANE, C. J. M.; BROWN, G. J. & PHELAN, K. D. Transforming growth factor- β 2 stimulates and inhibits neurogenesis of rat cerebellar granule cells in culture. *Developmental brain research*. 96: 46- 51, 1996.
- KIM, J. K.; RATHBONE, M. P.; MIDDLEMISS, P. J.; HUGHES, D. W. & SMITH, R. W. Purinergic stimulation of astroblast proliferation: guanosine and its nucleotides stimulate cell division in chick astroblast. *Journal of neuroscience research*. 28: 442-455, 1991.
- KIMELBERG, H. K. & NOREMBERG, M. D. Astrocytes. *Scientific American*. 260: 44-52, 1989.
- KUCHENBAUER, F.; HOPFNER, U.; STALLA, J. A.; STALLA, G. K. & PAEZ-PEREDA, M. Extracellular matrix components regulate ACTH production and proliferation in corticotroph tumor cells. *Molecular and cellular endocrinology*. 175: 141-148, 2001.
- KUHN, H. G.; WINKLER, J. KEMPERMANN, G. THAL, L. J. & GAGE, F. H. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *Journal of neuroscience*. 17: 5820-5829, 1997.
- KUHN, T. B.; SCHMIDT, M. F. & KATER, S. B. Laminin and fibronectin guideposts signal sustained but opposite effects to passing growth cones. *Neuron*. 14: 275-285, 1995.
- LARA, D. R.; SCHMIDT, A. P.; FRIZZO, M. E. S.; BURGOS, J. S.; RAMÍREZ, G. & SOUZA, D. O. Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. *Brain Research*. 912: 176-180, 2001.

- LEFRANÇOIS, T.; FAGES, C.; PESCHANSKI, M. & TARDY, M. Neuritic outgrowth associated with astroglial phenotypic changes induced by antisense glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA in injured neuron-astrocyte cocultures. *Journal of neuroscience*. 17: 4121-4128, 1997.
- LETOURNEAU P. C.; CONDIC, M. L. & SNOW, D. M. Interactions of developing neurons with the extracellular matrix. *Journal of neuroscience*. 14: 915-928, 1994.
- LETOURNEAU, P. C.; PECH, I. V.; ROGERS, S. L.; PALMS, S. L.; MCCARTHY, J. B. & FURCHT, L. T. growth cone migration across extracellular matrix components depends on integrin but migration across glioma cells does not. *Journal of neuroscience*. 21: 286-297, 1988.
- LIESI, P.; HAGER, G.; DODT, H. U.; SEPPALA, I. & ZIEGLGANSBERGER, W. Domainspecific antibodies against the B2 chain of laminin inhibit neuronal migration in the neonatal rat cerebellum. *Journal of neuroscience research*. 40: 199-206, 1995.
- LIN, W.; WANG, S.M.; HUANG, T.F.; FU, W.M. Differential regulation of fibronectin fibrillogenesis by protein kinases A and C. *Connective tissue research*. 43:22-31, 2002.
- LUCKENBILL-EDDS, L. Laminin and the mechanism of neuronal growth. *Brain Research Review*. 23: 1-27, 1997.
- MALCON, C.; ACHAVAL, M.; KOMLUS, S.; PARTATA, W.; S; AURESSIG, M.; RAMÍREZ, G. & SOUZA, D. O. GMP protects against quinolinic acid-induced loss of NADPH diaphorase-positive cells in the rat striatum. *Neuroscience letters*. 225: 145-148, 1997.
- MARTINEZ, R. & GOMES, F. C. A. Neuritogenesis induced by thyroid hormone-treated astrocytes is mediated by epidermal growth factor/mitogen-activated protein

- kinasephosphatidylinositol 3-kinase pathways and involves modulation of extracellular matrix proteins. *The Journal of biological chemistry*. 277: 49311-49318, 2002.
- MENET, V.; RIBOTA, M. G.; CHAUVET, N.; CRIAN, M. J.; LANNOY, J.; COLUCCIGUYON, E. & PRIVAT, A. Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression. *Journal of neuroscience*. 16: 6147-6158, 2001.
- MILNER, R. & CAMPBELL, L. Cytokines regulate microglial adhesion to laminin and astrocyte extracellular matrix via protein kinase C-dependent activation of the $\alpha 6 \beta 1$ integrin. *Journal of neuroscience*. 22: 1562-1572, 2002.
- MIRANTI, C.K.; BRUGGE, J.S. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nature cell biology*. 4(4): E83-E90. Review, 2002.
- MOLZ, S.; DECKER, H.; OLIVEIRA, I.J.L.; SOUZA, D.O.; TASCA, C.I. Neurotoxicity induced by glutamate in glucose-deprived rat hippocampal slices is prevent by GMP. *Neurochemical research*. 30:83-89, 2005.
- MOLZ, S.; OLIVEIRA, I. J. L.; SOUZA, D. O. & TASCA C. I. GMP prevents toxicity in hippocampal slices submitted to glutamate in a chemical model of ischemia. *Journal of Neurochemistry*. 79: 196, Abstract BP23-33, 2001.
- MONAHAN, J. B.; HOOD, W. F.; MICHEL, J. & COMPTON, R. P. Effects of guanine nucleotides on N-methyl-D-aspartate receptor-ligand interactions. *Molecular pharmacology*. 34: 111-116, 1988.
- MORRIS, A. J. & MALBON, C. G. Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiological reviews*. 79: 1373-1430, 1999.
- MULLER, C.E., SCIOR, T. 1993. Adenosine receptors and their modulators. *Pharmaceutica*

Acta Helvetiae. 68, 77-111.

- NAGEL, M. & WINKLBAUER, R. Establishment of substratum polarity in the blastocoel root of *Xenopus* embryo. *Development.* 126: 1975-1984, 1999.
- NEARY, J.T. AND ZHU, Q. Signaling by ATP receptors in astrocytes. *Neuroreport.* 5: 1617-1620, 1994.
- NEARY, J.T.; RATHBONE, M.P.; CATTABENI, F.; ABBRACCHIO, M.P.; BURNSTOCK, G. Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *Trends in neurosciences.* 19: 13-18, 1996.
- NEDERGAARD, M.; TAKAHIRO, T. & HANSEN, A. J. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nature reviews. Neuroscience.* 3: 748-755, 2002
- NEGRI, C.; DONZELLI, M.; BERNARDI, R.; ROSSI, L.; BURKLE, A. & SCOVASSI, A. I. Multiparametric staining to identify apoptotic human cells. *Experimental cell research.* 234: 174-177, 1997.
- OLIVEIRA, I. J. L.; MOLZ, S.; SOUZA, D. O. & TASCA, C. I. Neuroprotective effect of GMP in hippocampal slices submitted to an *in vitro* model of ischemia. *Cellular and molecular neurobiology.* 22: 335-344, 2002.
- PAAS, Y.; DEVILLERS-THIERY, A.; CHANGEUX, J.-P.; MEDEVIELLE, F. & TEICHBERG, V.I. Identification of an extracellular motif involved in the binding of guanine nucleotides by a glutamate receptor. *The EMBO journal.* 15: 1548-1556, 1996.
- PALU, E. & LIESI, P. Differential distribution of laminins on Alzheimer disease and normal human brain tissue. *Journal of Neuroscience Research.* 69: 243-256, 2002.

- PAZ, M. M.; RAMOS, M.; RAMÍREZ, G. & SOUZA, D. O. Differential effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase activity in chick optic tectum. *FEBS Lett.* 355: 205-208, 1994.
- PESHEVA, P. & PROBSTMEIER, R. The yin and yang of tenascin-R in CNS development and pathology. *Progress in neurobiology.* 61: 465-493, 2000.
- PFRIEGER F. W. & BARRES, B. A. Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science.* 277: 1684-1687, 1997.
- PORCIÚNCULA, L. O.; VINADÉ, L.; WOFCHUK, S. & SOUZA, D. O. Guanine based purines inhibit [³H]glutamate and [³H]AMPA binding at postsynaptic densities from cerebral cortex of rats. *Brain Research.* 928: 106-112, 2002.
- RAKIC, P. Elusive Radial Glial Cells: Historical and Evolutionary Perspective. *Glia.* 43: 19-32, 2003.
- RATHBONE, M. P. & JUURLINK, B. Hippocampal neurons in vitro respond to extracellular guanosine and GTP with neurite outgrowth and branching. *Abstracts - Society for Neuroscience.* 19: 88, (424.7), 1993.
- RATHBONE, M. P.; MIDDLEMISS, P. J.; GYSBERS, W. J.; ANDREW, C.; HERMAN, M. A. R.; REED J. K.; CICCARELLI, R.; IORIO, P. D. & CACIAGLI, F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Progress in neurobiology.* 39: 663-690, 1999.
- RATHBONE, M.P.; CHRISTJANSON, L.; DEFORGE, S.; DELUCA, B.; GYSBERS, J.W.; HINDLEY, S.; JOVETICH, S.; MIDDLEMISS, P.J.; TAKHAL, S. Extracellular purine nucleosides stimulate cell division and morphogenesis: pathologic and physiological implications. *Medical hypotheses.* 37: 232-240, 1992a.

- RATHBONE, M.P.; MIDDLEMISS, P.J.; ANDREW, C.; CACIAGLI, F.; CICCARELLI, R.; DI IORIO, P.; HUANG, R. The trophic effects of purines and purinergic signaling in pathogenic reactions of astrocytes. *Alzheimer disease and associated disorders*. 12: S36-S45, 1998.
- REGNER, A.; RAMÍREZ, G.; BELLÓ-KLEIN, A. & SOUZA, D. O. Effects of guanine nucleotides on glutamate-induced chemiluminescence in rat hippocampal slices submitted to hypoxia. *Neurochemical Research*. 23: 523-528, 1998.
- REICHARDT, L. F. & TOMASELLI, K. J. Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annual review of neuroscience*. 14: 531-570, 1991.
- REICHARDT, L. F. & TOMASELLI, K. J. Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annual review of neuroscience*. 14: 531-570, 1991.
- ROUNDS, S.; YEE, W.L.; DAWICKI, D.D.; HARRINGTON, E.; PARKS, N.; CUTAIA, M.V. Mechanism of extracellular ATP- and adenosine-induced apoptosis of cultured pulmonary artery endothelial cells. *The American journal of physiology*. 275: L379-L388, 1998.
- RUBIN, M. A.; JURACH, A.; DA COSTA-JÚNIOR, E. M.; LIMA, T. T. F.; JIMÉNEZBERNAL, R. E.; BEGNINI, J.; SOUZA, D. O. & DE MELLO, C. F. GMP reverses the facilitatory effect of glutamate on inhibitory avoidance task in rats. *NeuroReport* 7: 2078-2080, 1996.
- RUBIN, M. A.; JURACH, A.; ZANOLLA, G. R.; BOENO, R.; SOUZA, D. O. & MELLO, C. F. Intrahippocampal GMP administration improves inhibitory avoidance performance through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats. *NeuroReport* 8: 3713-2316,

1997.

SANTOS, T.G. Estudo da modulação do transporte sinaptossomal de L-[³H] glutamato por derivados da guanina e seu papel como neurotransmissores. Dissertação de mestrado, UFSC, Florianópolis, 2005.

SANTOS, T.G.; SOUZA, D.O.; TASCA, C.I. GTP uptake into rat brain synaptic vesicles. *Brain Research*. Article in press.

SCHMIDT, A. P.; LARA, D. R.; MARASCHIN, J. F.; PERLA, A. S. & SOUZA, D. O. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Res.* 864: 40-43, 2000.

SCHMIDT, A.P.; ÁVILA, T.T.; SOUZA, D.O. Intracerebroventricular guanine-based purines protect against seizures induced by quinolinic acid in mice. *Neurochemical Research*. 30:69-73, 2005.

SCHWARTZ, M. A. Integrin signaling revisited. *Trends in cell biology*. 11: 466-470, 2001.

SECHELER, J. L. & SCHWARZBAUER, J. E. Control of cell cycle progression by fibronectin matrix architecture. *The Journal of biological chemistry*. 40: 25533-25536, 1998.

SERINI, G.; BOCHATON-PIALLAT, M. L.; ROPRAZ, P.; GEINOZ, A.; BORSI, L.; ZARDI, L. & GABBIANI, G. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor- β 1. *The Journal of cell biology*. 142: 873-881, 1998.

SOARES, F.; SCHMIDT, A.P.; FARINA, M.; FRIZZO, M.E.S.; TAVARES, R.G.; PORTELA, L.V.C.; LARA, D.R.; SOUZA, D.O. Anticonvulsant effect of GMP depends on its conversion to guanosine. *Brain Research*. 1005:182-186, 2004.

- SOLLINI, A.; IACOBINI, C.; RICCI, R.; CHIOZZI, P.; AMADIO, L.; PRICCI, F.; DI MARIO, U.; DI VIRGILIO, F.; PUGLIESE, G. Purinergic modulation of mesangial extracellular matrix production: Role in diabetic and other glomerular diseases. *Kidney International*. 67: 875-885, 2005.
- SOUZA, D. O. & RAMÍREZ, G. Effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase in chick optic tectum and cerebellum. *Journal of molecular neuroscience*. 3: 39-45, 1991.
- SOUZA, D. O. & RAMÍREZ, G. Effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase in chick optic tectum and cerebellum. *Journal of molecular neuroscience*. 3: 39-45, 1991.
- STEWART, G. R. & PEARLMAN, A. L. Fibronectin-like immunoreactivity in the developing cerebral cortex. *Journal of molecular neuroscience*. 7: 3325-3333, 1987.
- STONE, T.W., 1991. Receptors for Adenosine and adenine nucleotides. *General. Pharmacol.* 22, 25-31.
- STREULI, C. Extracellular matrix remodeling and cellular differentiation. *Current opinion in neurobiology*. 11: 634-640, 1999.
- SZONDY, Z. Adenosine stimulates DNA fragmentation in human thymocytes by Ca^{2+} mediated mechanisms. *The Biochemical journal*. 304: 877-885, 1994.
- TASCA, C. I. & SOUZA, D. O. Interaction of adenosine and guanine derivatives in the rat hippocampus: effects on cAMP levels and on the binding of adenosine analogues and GMP. *Neurochemical Research*. 25: 181-188, 2000.
- TASCA, C. I.; BURGOS, J. S.; BARAT, A.; SOUZA, D. O. & RAMÍREZ, G. Chick kainate binding protein lacks GTPase activity. *Neuroreport* 10: 1981-1983, 1999a.

- TASCA, C. I.; CARDOSO, L. F.; MARTINI, L. H. & SOUZA, D. O. Effects of guanine nucleotides on adenosine and glutamate modulation of cAMP levels in optic tectum slices from chicks. *Neurochemical International*. 34: 213-220, 1999b.
- TASCA, C. I.; CARDOSO, L. F.; MARTINI, L. H.; RAMÍREZ, G. & SOUZA, D. O. Guanine nucleotides inhibit cAMP accumulation induced by metabotropic glutamate receptors activation. *Neurochemical International*. 23: 183 -188, 1998.
- TASCA, C. I.; WOFCHUK, S. T.; SOUZA, D. O.; RAMÍREZ, G. & RODNIGHT, R. Guanine nucleotides inhibit the stimulation of GFAP phosphorylation by glutamate. *Neuroreport* 6: 249-252, 1995.
- TASCA, C.I.; VENDITE, D.; MARTINI, L.H.; CARDOSO, L.F.; SOUZA, D.O. Modulation of adenosine-induced cAMP accumulation via metabotropic glutamate receptors in chick optic0 tectum. *Neurochemical Research*. 20:1033-9, 1995b.
- TASCA, C.I.; SANTOS, T.G.; TAVARES, R.G.; BATTASTINI, A.M.O.; ROCHA, J.B.T.; SOUZA, D.O. Guanine derivates modulate L-glutamate uptake into rat brain synaptic vesicles. *Neurochemical International*. 44:423-431, 2004.
- TAVARES, R.G.; SCHMIDT, A.P.; ABUD, J.; TASCA, C.I.; SOUZA, D.O. In vivo quinolinic acid increases synaptosomal glutamate release in rats: reversal by guanosine. *Neurochemical Research*. 30: 439-444, 2005.
- THANGNIPON, W.; KINGSBURY, A.; WEBB, M. & BALÁZ, R. Observations on rat cerebellar cells in vitro: influence of substratum, potassium concentration and relationship between neurones and astrocytes. *Developmental brain research*. 11: 177-189, 1983.
- TRAVERSA U.; BOMBU, G.; DI IORIO, P.; CICCARELLI, R.; WERSTIUK, E. S. & RATHBONE, M.P. Specific [3 H]-guanosine binding sites in rat brain membranes. *British*

journal of pharmacology. 135: 969-976, 2002.

TRENTIN, A. G.; ROSENTHAL, D. & MOURA NETO, V. Thyroid hormone and conditioned medium effects on astroglial cells from hypothyroid and normal rat brain: factor secretion, cell differentiation and proliferation. *Journal of Neuroscience Research*. 41: 409-417, 1995.

TRENTIN, A.G.; AGUIAR, C.B.N.M.; GARCEZ, R.C.; ALVAREZ-SILVA, M. Thyroid hormone modulates the extracellular matrix organization and expression in cerebellar astrocyte: effect on astrocyte adhesion. *Glia*. 42: 359-369, 2003.

VAN CALKER, D.; MULLER, M.; HAMPRECHT, B. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *Journal of Neurochemistry*. 33:999-1005, 1979.

VENSTRON, K. A. & REICHARDT, L. F. Extracellular matrix 2: role of extracellular matrix receptors in the nervous system. *FASEB J*. 7: 996-1003, 1993.

WAKADE, T.D.; PALMER, K.C.; McCAULEY, R.; PRZYWARA, D.A.; WAKADE, A. R. Adenosine- induced apoptosis in chick embryonic sympathetic neurons: a new physiological role for adenosine. *The American journal of physiology*. 488: 123-138, 1995.

WIERZBICKA-PATYNOWSKI, I. AND SCHAWRZBAUER, J.E. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *Journal of Cell Science*. 116:3269-3276, 2003.

WU, C.; KEIGHTLEY, S. Y.; LEUNG-HAGESTEIJN, C.; RADEVA, G.; COPPOLINO, M.; GOICOECHEA, S.; McDONALD, J. A. & DEDHAR, S. Integrin-linked protein kinase regulates fibronectin matrix assembly, E-cadherin expression, and tumorigenicity. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 526-536, 1998.

YANG, R.S.; TANG, C.H.; LING, Q.D.; LIU, S.H.; FU, W.M. Regulation of fibronectin

fibrillogenesis by protein kinases in cultured rat osteoblasts. *Molecular pharmacology*. 61:1163-1173, 2002.

ZAGRIS, N. Extracellular matrix in development of the early embryo. *Micron*. 32:427-438, 2001.